

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
der Philipps – Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Axel Wilke

**Zytokinprofil einer humanen
Knochenmarkszellkultur nach Exposition mit
Ultra – High – Molecular – Weight – Polyethylen –
Abriebpartikeln**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps – Universität Marburg vorgelegt

von
Ingo Bartsch

aus Mannheim
Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps – Universität Marburg am
16.06.2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Dr. Wilke

Koreferent: PD Dr. Jaques

2. Korreferent: Prof. Dr. Gemsa

„Und ob ich schon wanderte im finsternen Thal, fürchte ich kein Unglück, denn du bist bei mir; dein Stecken und Stab trösten mich“

Psalm 23, Vers 4

„nach der deutschen Uebersetzung Dr. Martin Luthers

Cöln 1879“

Diese Arbeit ist meinem Vater,
Dr. Günther Bartsch,
der am 21. September 2000 verstorben ist,
meiner Mutter
Inge Bartsch – Haijenga,
meinen Brüdern
Prof. Dr. Dirk – Uwe Bartsch
Dr. Torsten Bartsch
sowie deren Familien
und meiner Freundin
Anél du Plessis
in Dankbarkeit gewidmet

***Zytokinprofil einer humanen
Knochenmarkszellkultur nach Exposition
mit Ultra –High – Molecular – Weight –
Polyethylen - Abriebpartikeln***

***Von
Ingo Bartsch***

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <i>I. Einleitung</i> | 7 |
| 1.1. Geschichtlicher Überblick | 7 |
| 1.1.2. Derzeitige Probleme in der Endoprothetik | 10 |
| 1.1.3. Partikelkrankheit | 12 |
| 1.1.3.1. Klinisches Beispiel für Metall – Abrieb aus einer Hüft – Totalendoprothese | 19 |
| 1.1.4. Zellkultur und Tierversuche | 23 |
| 1.1.5. Zellarten | 24 |
| 1.2. Entzündungsreaktion | 26 |
| 1.3. Zytokine | 27 |
| 1.3.1. Interleukin – 1 β | 28 |
| 1.3.2. Interleukin – 6 | 29 |
| 1.3.3. Tumor Nekrose Faktor – α | 30 |
| 1.4. Hämatopoese und Wachstumsfaktoren | 31 |
| 1.4.1. Granulopoese | 32 |
| 1.4.2. Monozytäres System | 33 |
| 1.4.3. Lymphopoese | 34 |
| 1.4.4. Interleukin – 3 (Multi – CSF) | 35 |
| 1.4.5. Granulozyten – Makrophagen – Kolonie – Stimulierender Faktor (GM – CSF) | 36 |
| 1.5. Knochenstoffwechsel | 37 |
| 1.6. Fragestellung | 38 |
| <i>II. Material und Methoden</i> | 40 |
| 2.1. Knochenmarkspräparation | 40 |
| 2.2 Beschreibung und Untersuchung des Testmaterials. | 44 |
| 2.2.1. Kollagen Typ 1 | 48 |
| 2.3 Versuchsaufbau | 49 |
| 2.4. Zellzahl – Bestimmung | 52 |
| 2.5. Giemsa – Färbung | 52 |
| 2.6. Messung der Zytokine | 53 |
| 2.7. Messung der LDH | 54 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.8. Aufbereitung der Zellkulturen für die Rasterelektronenmikroskopie | 54 |
| 2.9. FACS – Analyse | 54 |
| 2.9.1. Aufbereitung der Zellen | 56 |
| 2.9.2. CD – 2 | 56 |
| 2.9.3. CD – 3 | 57 |
| 2.9.4. CD – 4 | 57 |
| 2.9.5. CD – 14 | 57 |
| 2.9.6. CD – 19 | 57 |
| 2.9.7. CD – 34 | 57 |
| 2.9.8. CD – 66b | 58 |
| 2.10. Statistik | 58 |
| 2.10.1. t – Test für unverbundene Stichproben | 58 |
| 2.10.2. t – Test für verbundene Stichproben | 61 |
| 2.11. Liste der verwendeten Materialien und Geräte | 62 |
| 2.12. Abkürzungsverzeichnis | 65 |
| III. Ergebnisse | 67 |
| 3.1. Kontrolle von Zelloberflächenantigenen (Zelldifferenzierung) | 67 |
| 3.1.1. Einfluß des verwendeten Kollagen Typ 1 auf die Freisetzung von Mediatoren in der Kontrollkultur | 67 |
| 3.2. Zellzahlbestimmung über den Kulturzeitraum von zwei Wochen | 73 |
| 3.3. Zytokinprofil der Zellkultur bei Exposition mit UHMW – PE Partikeln | 77 |
| 3.3.1. Interleukin – 6 (IL – 6) | 77 |
| 3.3.2. Interleukin – 1 β | 81 |
| 3.3.3. Tumornekrosefaktor – α | 84 |
| 3.3.4. Lactatdehydrogenase | 88 |
| 3.4. Zelldifferenzierung im Verlauf der zweiwöchigen Kulturdauer mittels FACS Analyse | 92 |
| 3.4.1. CD – 14 | 93 |
| 3.4.2. CD – 34 | 103 |
| 3.4.3. CD – 66b | 110 |
| 3.4.4. CD – 3 positive, CD – 4 positive Zellen (t – Helfer Zellen) | 119 |
| 3.4.5. CD – 3 positive, CD – 4 negative Zellen (zytotoxische Zellen) | 129 |
| 3.4.6. CD – 19 | 136 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|---------|
| 3.4.7. CD – 2 | 143 |
| 3.5. Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Zellkultur nach 14 Tagen | 152 |
| 3.6. Giemsa – gefärbte Bilder der Zellkultur nach 14 Tagen | 154 |
| IV. Diskussion | 156 |
| 4.1. Diskussion der Ergebnisse | 159 |
| 4.1.1. Zellzahlen | 159 |
| 4.1.2. Zytokine | 159 |
| 4.1.3. LDH | 160 |
| 4.1.4. FACS – Analyse | 161 |
| 4.1.5. Zytokinprofil bei verschiedenen Zellzahlen ohne Partikelzusatz | 164 |
| 4.1.6. Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Mediatoren | 164 |
| 4.1.7. Vergleich mit anderen Zellkulturstudien | 164 |
| 4.2. Vorgang der partikelinduzierten, aseptischen Prothesenlockerung | 166 |
| 4.3. Resümee | 169 |
| 4.4. Ausblick | 169 |
| V. Zusammenfassung | 171 |
| 5. 1. Fragestellung | 171 |
| 5.2. Material und Methoden | 171 |
| 5.3. Ergebnisse | 172 |
| 5.4. Diskussion | 172 |
| VI. Literaturverzeichnis | 174 |

1. Einleitung

Die in unserer Gesellschaft steigende Lebenserwartung und der berechtigte Wunsch nach Mobilität auch in einem höherem Alter, hat dazu geführt, dass einem der häufigsten Probleme seitens des Bewegungsapparates in den letzten Jahrzehnten eine ständig wachsende Bedeutung zukommt: Dem Hüftgelenksverschleiß.

Da die Möglichkeiten der konservativen Therapie mit physikalischen, schmerztherapeutischen und krankengymnastischen Maßnahmen enge Grenzen gesetzt sind, werden die operativen Eingriffe immer weiter entwickelt, um dem Ziel der möglichst komplikationsarmen, langlebigen Hüftprothese ein Stück näher zu kommen.

1.1 Geschichtlicher Überblick

Die ersten operativen Eingriffe zur Behandlung von Gelenkfehlstellungen wurden im frühen 19. Jahrhundert durchgeführt.

1826 führte John Rhea Barton zum ersten Mal eine Hüftgelenksosteotomie durch, damals mit dem Ziel der Behandlung einer posttraumatischen Hüftgelenksankylose [Barton JR 1827].

Inspiziert durch dieses Operationsverfahren, versuchten sich viele Institutionen an einer Weiterentwicklung der Operationstechnik nach Barton.

Hieraus entstand die Technik der subkutanen Osteotomie, wie sie dann von Langenbeck erstmals im Jahre 1852 durchgeführt wurde.

Mit der Einführung der Äthernarkose in die Chirurgie durch Morton (1846) und den Prinzipien der Antisepsis durch Lister wurden die Voraussetzungen für Operationen mit nicht vitaler Indikation geschaffen [Vander Elst, 1978, Lister 1867].

Diese Maßnahmen führten zu einer Aufbruchstimmung in vielen Bereichen der Chirurgie und Orthopädie und es ergaben sich viele neue Operationsmöglichkeiten.

1880 wurde dann von Wolff als neue Methode der Gelenkmobilisation eine Arthrolyse vorgestellt. Dieses Modell wurde dann 1902 von Kocher modifiziert, der eine zusätzliche Luxation der Gelenkpartner favorisierte.

Etwa zur gleichen Zeit wurde an Interpositionsarthroplastiken gearbeitet, die anorganische Interponate verwendeten. Diese anorganischen Interponate bestanden aus

Holz, Silber, Magnesium, Elfenbein, Goldfolie, Zink, Zelluloid und Guttapercha [Baer WS 1918, Hoffa 1906, Mac Ausland 1924].

Im Jahre 1890 führte der Berliner Chirurg Themistocles Gluck eine revolutionäre Operation durch, die als Anfang der Endoprothetik gewertet werden muss. Gluck ersetzte ein mit einer Infektion zerstörtes Knie einer Patientin durch ein künstliches Gelenk aus Elfenbein [Gluck, 1890]. Die Versuche blieben allerdings aufgrund des Fehlens geeigneter Materialien und Verankerungsmethoden sowie der hohen Rate an allgemeinen Komplikationen ohne längerfristigen Erfolg. Die ganze Idee trat für Jahrzehnte in den Hintergrund. Auf dem Gebiet der Gelenkchirurgie erlebte die Interpositionsplastik eine Weiterentwicklung in deren Zuge Operateure wie Franz König (1832 – 1910), Georg Axhausen (1877 – 1960) oder Erich Lexer (1867 – 1937) beachtliche Erfolge erzielen konnten um damit auch für die später wieder aufgegriffene Endoprothetik im engeren Sinne einen wichtigen Grundstock an Erkenntnissen zu erarbeiten [Paul, 1983, 1988; Taubert, 1983].

Die von Smith – Peterson 1923 eingeführte Mould-Plastik, eine gläserne Kappe für den Hüftkopf, bedeutete damals einen durchaus beachtlichen Fortschritt, der dem Patienten eine Verbesserung der Lebensqualität für einen Zeitraum von mehreren Jahren ermöglichen konnte. Das Interponat bestand zunächst aus gewöhnlichen Glas, später aus Pyrexglas, Viscaloid und Bakelit. 1938 wurde zum ersten Mal Vitallium verwendet [Smith-Peterson, 1939].

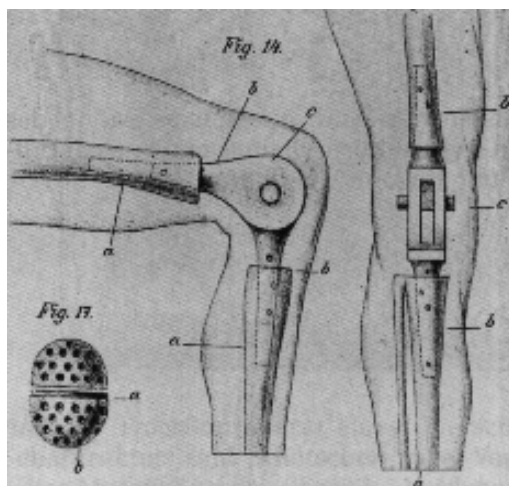


Abb.1: Knieendoprothese nach Gluck (1890)

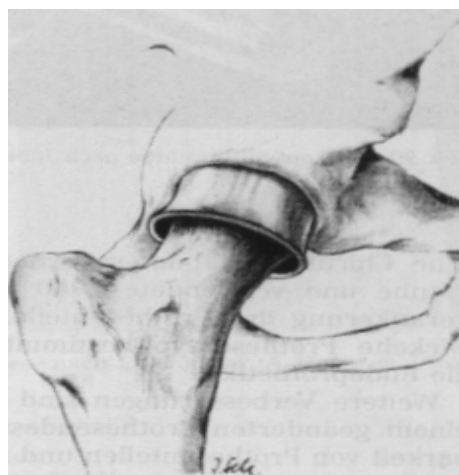


Abb.2: Mould – Plastik (1939)

Smith – Peterson und Ausfranc konnten später zeigen, dass zwischen dem Interponat und dem Knochen ein fibrocartilaginärer Umbau stattfand, bei dem es zu trophischen Störungen kam, die dann nachfolgend mit Nekrosen einhergingen [Smith – Peterson, 1948, 1938; Ausfranc 1937].

In Deutschland verwendete Lexer sowohl autogene, allogene und xenogene Transplantate wie Muskelfaszie, Fettlappen, Muskel und Schweineblase als auch anorganische Interpositionsimplantate wie Magnesium, Silber und Goldfolie als Knorpelersatz ein [Lexer, 1924].

Erst 1947 wurde die Idee von Gluck wieder aufgegriffen. Die Brüder Judet implantierten einen künstlichen Hüftkopf der aus Plexiglas bestand und mit einem dünnen Stil im Femur befestigt wurde. Deformierungen des Kunststoffes, Fremdkörperreaktionen und Lockerungen des Implantats zwangen allerdings bei vielen Patienten zum Ausbau der Prothese. Der Giessener Orthopäde Rettig, der in den 40er Jahren ebenfalls an der Entwicklung von Plexiglas – Endoprothesen arbeitete, kämpfte mit ähnlichen Problemen [Weber 1928].

Auch Moore stieß bei der Entwicklung seiner Hüftkopfprothese im Jahre 1952 trotz einer verbesserten Verankerung und besser geeignetem Material auf bereits bekannte Schwierigkeiten.

Erst als Sir John Charnley 1960 sowohl eine künstliche Pfanne, als auch einen sehr gut durchdachten Schaft, den er mit Polymethylmethacrylat als Knochenzement im Femur verankerte, konnten befriedigende Langzeitergebnisse erzielt werden [Charnley 1960].



Abb.3: Sir John Charnley (1911-1982)

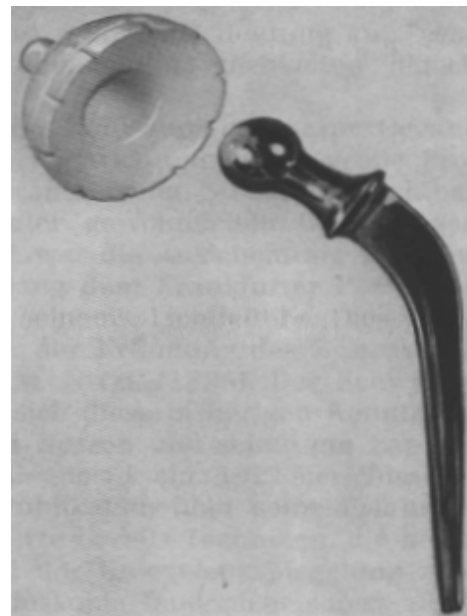


Abb.4: Hüftendoprothese nach Charnley

Sowohl heutige Hüftendoprothesen als auch Neuentwicklungen müssen sich nach wie vor an den Ergebnissen der von Charnley entwickelten Low – Friction – Arthroplasty zu messen.

Ob die zementierten und zementfreien Implantate, an deren Weiterentwicklung mit viel Eifer und großen Hoffnungen gearbeitet wird, die Hoffnungen, die in sie gesetzt werden in Zukunft erfüllen werden, bleibt abzuwarten.

1.1.2. Derzeitige Probleme in der Endoprothetik sowie die Ursachen der Lockerung von Endoprothesen

Die aseptische Lockerung implantierter künstlicher Gelenke ist heutzutage das führende Problem in der Endoprothetik [Gruen et. al. 1979; Ahnfelt etl al. 1990; Malchau et. al. 1993].

Um ein optimales Ergebnis bei der Integration von Hüftendoprothesen in das knöcherne Implantatlager erzielen zu können, hat man versucht, sowohl die biomechanischen als auch die werkstofftechnischen Einflußgrößen zu optimieren.

Als werkstofftechnische Einflußgrößen bezeichnet man die Biokompatibilitätseigenschaften des Implantats wie die physikochemischen Eigenschaften und das biologische Verhalten im Organismus.

Zu den biochemischen Eigenschaften zählt man die Prothesensteifigkeit, welche definiert ist als das Produkt aus dem E – Modul und dem Flächenträgheitsmoment.

Für Biomaterialien, die als Gleitpartner in der Alloarthroplastik eingesetzt werden ist vor allen Dingen die Bestimmung der Verschleißfestigkeit von Bedeutung.

In verschiedenen Testverfahren kann das Reibungsverhalten unterschiedlicher Biomaterialien untereinander analysiert werden.

Der sich für den Verschleiß ergebene charakteristische Reibungskoeffizient ist stark von der Wahl der verwendeten Biomaterialien und der dazugehörigen Oberflächenbeschaffenheit abhängig.

Durch die Reibung der beiden Gelenkpartner können beide oder nur eine der Reibungsflächen beschädigt werden.

Die Oberflächen rauhen ab, es kommt zu Materialverlust mit der Bildung von Abriebpartikeln, die dann im Organismus verschiedene lokale und systemische Reaktionen hervorrufen können. Durch den Verschleiß an der Materialoberfläche kann zusätzlich ein Korrosionsvorgang initiiert werden.

Damit ist klar, dass sich eine unzureichende Prothesenmaterialverschleißfestigkeit mit seinen vielfältigen Folgeerscheinungen insgesamt negativ auf die dauerhafte Implantatverankerungsfestigkeit auswirkt.

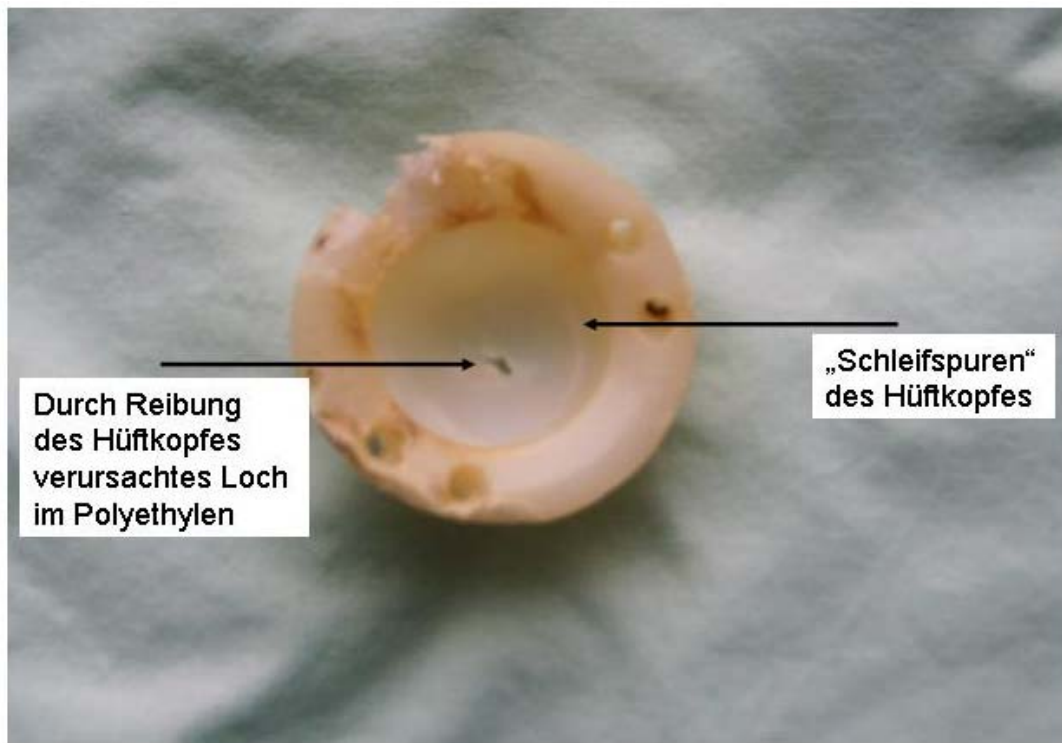


Abb.5: Durch Reibung entstandene Schäden an einer Polyethylenpfanne aus einer Hüft - TEP



Abb.6: Durch Reibung entstandene Schäden an dem Femurstück einer Knie - TEP

Die Aufgabe von Studien zur Analyse von Biomaterialeigenschaften besteht in der Bestimmung sowohl der „in vitro“ als auch der „in vivo“ Verträglichkeit und Beständigkeit.

Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Immunantwort, die eventuelle Cancerogenität und Toxizität gelegt. Bei einer auf Metallhaptene sensibilisierten Person ist die typische Immunantwort eine zellvermittelte Immunantwort vom Typ IV mit verzögertem Wirkeintritt nach 48 – 72h.

Die in Deutschland und anderen europäischen Ländern verbreitete Einteilung der knöchernen Gewebereaktion auf Biomaterialien lässt sich auf Osborn zurückführen, welcher biotolerante Werkstoffe von bioinerten und bioaktiven Werkstoffen unterscheidet [Osborn 1979].

Die Sachverhalte, welche hier dargestellt wurden beinhalten die Grundvoraussetzungen für das Gelingen einer zementfreien Implantatverankerung. Wichtig ist neben der Biologie der Osteogenese die Anwendung eines Materials von hoher Biokompatibilität, welches möglichst frei von Abrieb ist.

1.1.3. Partikelkrankheit

Arthrose schränkt die Bewegungsfreiheit von Menschen seit Hunderten von Jahren ein. Menschen, die unter Arthrose leiden, konnte in den letzten Jahrzehnten auf verschiedene Weise geholfen werden. Als operative Therapie zur Behandlung der primären und sekundären Coxarthrose hat sich seit den 60er Jahren der Gelenkersatz klinisch etabliert.

Die zunehmende Implantation von Hüfttotalendoprothesen (Hüft – TEP) hat die Probleme wie die aseptische Prothesenlockerung deutlich gezeigt [Charnley, Follacci, et. al. 1968].

Die aseptische Prothesenlockerung ist nach einer repräsentativen Untersuchung mit einem Anteil von 79% der Hauptgrund für Revisionsoperationen nach primärem Hüftgelenkersatz [Herberts & Malchau 2000]. Insgesamt ist festzustellen, dass diese aseptische Lockerung in 4,2 % aller Fälle eine Revision in den ersten 10 Jahren nach Primärimplantation erforderlich macht [Herberts & Malchau 2000].

Die Ursache der aseptischen Prothesenlockerung ist in Knochenabbauprozessen zu suchen, die durch periimplantäre Fremdkörperreaktionen induziert werden. Die

Antigene sind in diesem Fall kleinste Abriebteilchen, die sowohl durch Beanspruchung der artikulierenden Gelenkflächen, als auch durch Mikrobewegungen an den Kontaktstellen zwischen Implantat und Knochen entstehen. Die Größe der so erzeugten Abriebpartikel ist abhängig von den jeweils verwendeten Materialien [Lee, Salvati, et. al. 1992].

Heutzutage finden in der Hüftendoprothetik verschiedene Gleitpaarungen Anwendung.

Folgende Gleitpaarungen werden verwendet:

Metall – Metall

Metall – Kunststoff

Keramik – Kunststoff

Keramik – Keramik

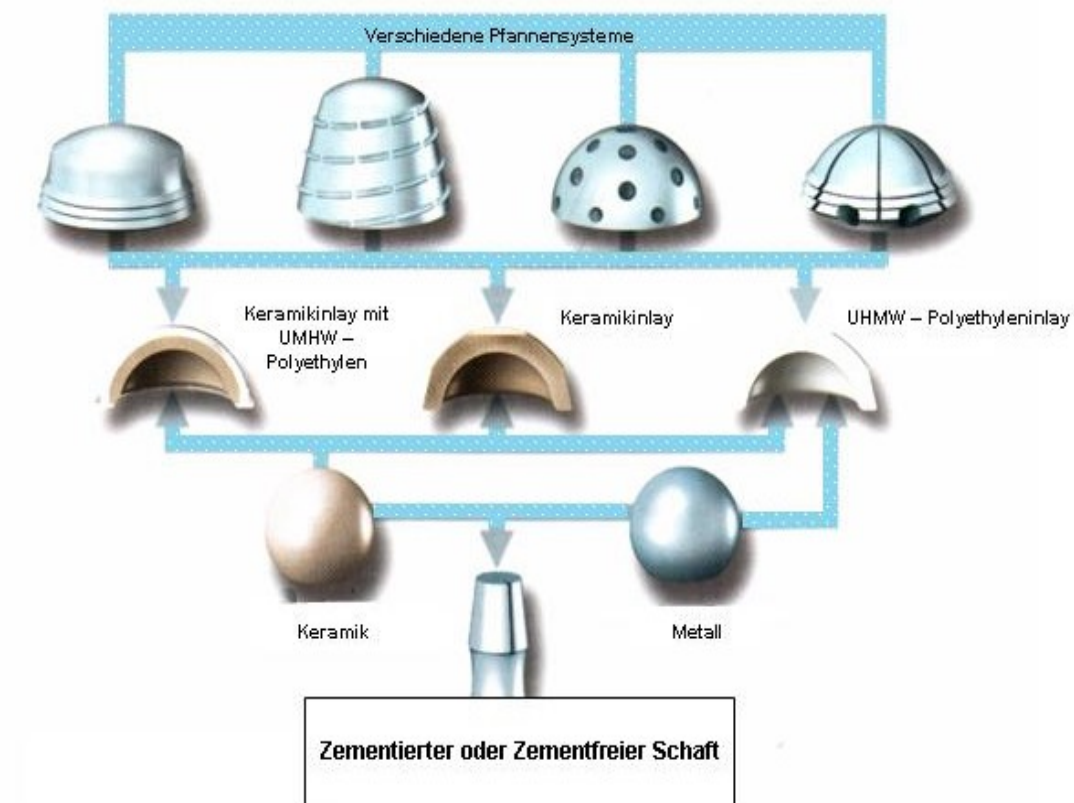


Abb.7: Verschiedene mögliche Gleitpaarungen und Hüftpfannensysteme

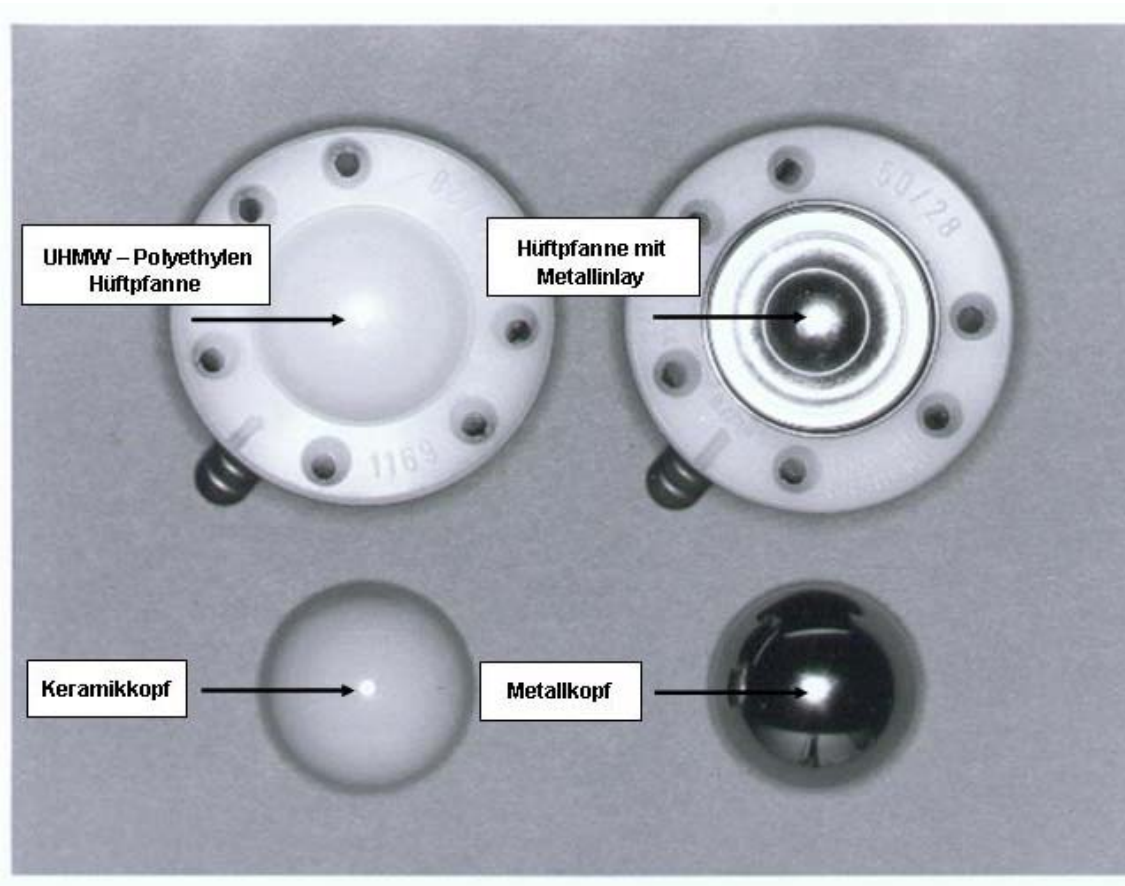


Abb.8: Die Gleitpaarungen Keramik – UMW – PE und Metall – Metall

Die am häufigsten verwendete Gleitpaarung ist die mit einem Hüftkopf aus Aluminiumoxid – Keramik und einer Hüftpfanne aus UHMW – PE (Ultra High Molecular Weight Polyethylene). Diese Gleitpaarung hat einen durchschnittlichen Abrieb von ca. 0,1 mm / Jahr [Zichner 1996]

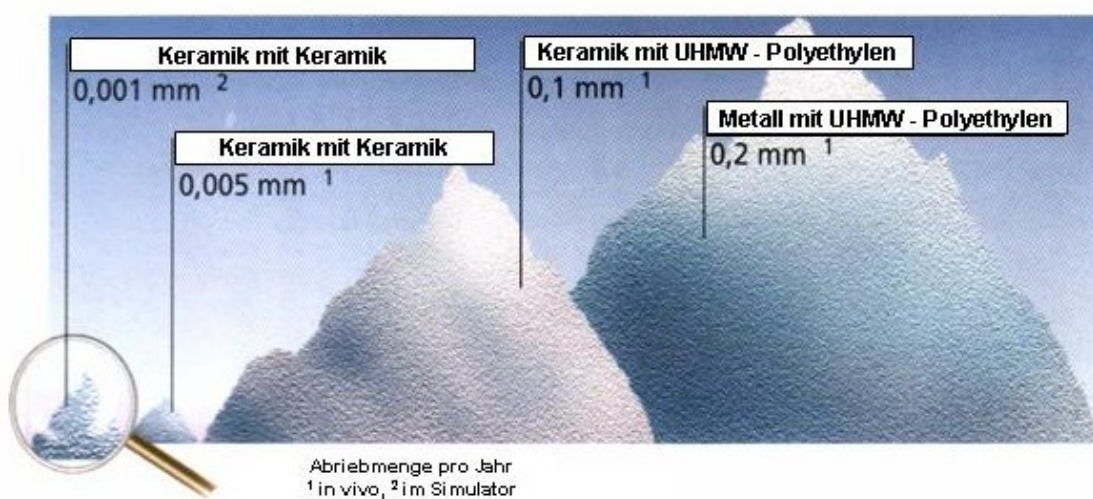


Abb.9: Darstellung des Abriebs bei verschiedenen Gleitpaarungen

Die beim Abrieb aus der Gleitpaarung Keramik – UHMW – PE entstehenden Partikel, die hauptsächlich aus der Hüftpfanne stammen, haben Größen von $< 0,5 \mu\text{m}$ bis zu $300 \mu\text{m}$ [Buchhorn, Willert 1995]

Die Menge des Abriebs, der bei der Verwendung von Metall – Metall oder Keramik – Keramik Gleitpaarungen entsteht ist zwar geringer als die bei UHMW – PE, jedoch ist Polyethylen der Werkstoff, dessen Wirkung auf den menschlichen Organismus in Langzeitstudien am besten erforscht ist. Langzeitergebnisse für die anderen in der Hüftendoprothetik verwendeten Werkstoffe liegen zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Eine bekannte Nebenwirkung bei der Verwendung von Metall – Metall Gleitpaarungen ist die

Reaktion des periartikulären Bindegewebes auf die entstehenden Metallpartikel, die sich makroskopisch als Schwarzverfärbung des Bindegewebes darstellt und als Metallose bezeichnet wird.

Neben diesen lokalen Effekten werden heutzutage auch die systemischen Folgen von Abriebpartikeln diskutiert. Es gibt Studien die bei der Verwendung von Metalllegierungen gelöste Metallionen in Haaren, Blutserum, lymphatischen Organen und Urin nachgewiesen haben [Coleman, Herrington, et. al. 1973; Dobbs & Minski 1980; Sunderman, Hopfer, et. al. 1989; Merrit & Brown 1996; Jakobs, Skipor, et. al. 1996; Savarino, Granchi, et. al. 1999]. Es wird jedoch noch weiterhin erforscht, welchen Einfluss diese Ionen auf das Immunsystem haben im Hinblick auf die Toxizität, die Sensibilisierung und eine mögliche Tumorinduktion [Lewis, Belniak, et. al. 1995; Savarino, Granchi, et. al. 1999]. Es gibt bereits Studien, die erhöhte Anteile von zytotoxischen T – Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NKZ) im Blut von Patienten bei Revisionseingriffen gefunden haben [Case, Langkammer, et. al. 2000]. Ob das allerdings ein Ausdruck einer allgemeinen Prädisposition dieser Patienten oder eine Reaktion auf den Kontakt mit Implantatmaterialien ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Polyethylen ist der am längsten in der Hüftendoprothetik verwendete Werkstoff und damit auch der am besten erforschte. Es ist der am meisten verwendete Werkstoff für die Innenflächen der künstlichen Gelenkpfannen bei der Implantation von Hüft – TEPs.

Es wurde bisher in den verschiedensten Zusammensetzungen verwendet. Polyethylen zeichnet sich durch ein hydrophobes Verhalten und eine niedrige Dichte aus. PE lässt sich in organischen Lösungsmitteln wie Alkohol lösen. Vor der Einführung des heute am meisten verwendeten Ultra Hoch verdichteten Polyethylen (UHMW – PE) wurde Hochverdichtetes oder Hochmolekulares Polyethylen als Werkstoff für künstliche Hüftpfannen verwendet. Hochmolekulares Hart-PE (HMW-PE) ist steifer und härter als Hart-PE. Ultrahochmolekulares Hart-PE (UHMW-PE) besitzt sehr gute Gleit- und Verschleißigenschaften. Es ist bis -150 °C kältebeständig und bis maximal +90 °C dauerwärmebeständig. Aufgrund minimaler Feuchtigkeitsaufnahme ist UHMW-PE besonders maßhaltig und toleranzstabil.

PE ist physiologisch unbedenklich und praktisch geruchlos und geschmacksneutral. Es ist stoß- und schlagfest, besitzt gute Gleiteigenschaften und nimmt nahezu keine Feuchtigkeit auf. In der Industrie findet UHMW – PE Anwendung bei Gleitplatten. Die ständige Weiterentwicklung und Verbesserung des Polyethylen hat dazu geführt, dass sich die heute am häufigsten verwendete Gleitpaarung von Keramik – UHMW – PE als diejenige mit den besten Abriebeigenschaften darstellt.

Die am häufigsten vorherrschende Partikelgröße bei der Verwendung von UHMW – PE wurde mit durchschnittlich 0,3 µm beschrieben. Durch die Beschaffenheit und die Eigenschaften von UHMW – PE kommt es allerdings immer wieder zu einer Konglomeratbildung mit einer Größe von UHMW – PE Konglomeraten von ca. 10 – 15 µm, die dann im periprotetischem Gewebe zu finden sind [Affatato, S. Fernandes, B et. al. 2000]. Entstandene Abriebpartikel gelangen vor allen Dingen in die Gelenkflüssigkeit und in die Gelenkkapsel, wo sie dann von ortständigen Gewebsmakrophagen phagozytiert werden oder von mehrkernigen Riesenzellen umschieden werden, falls sie für die Phagozytose zu groß sein sollten, was einen physiologischen Vorteil der entstandenen UHMW – PE Konglomerate gegenüber einzelnen Metallabriebpartikeln darstellt, die einfacher phagozytiert werden können [Willert 1977; H. G. Willert, G. H. Buchhorn, et. al. 2000, Howie 1990].

Aufgrund des Fremdkörperkontaktes beginnen die Makrophagen Interleukine und Chemokine auszuschütten und initiieren eine Immunreaktion. Zunächst besteht diese aus einer Entzündung mit histiozytären Infiltraten und Fremdkörperriesenzellen, zum Teil sind aber auch nekrotisierende Fremdkörpergranulome zu finden [Willert 1977; Pazzaglia, Dell'Orbo, et. al. 1987; H. G. Willert, G. H. Buchhorn, et. al. 2000]. Ein Teil

der Partikel gelangt durch perivaskuläre Lymphspalten in das lymphatische System und wird dann in die regionären Lymphknoten transportiert. Hier wird dann die Aktivierung der B – und T – Lymphozyten verursacht [Willert 1977]. Es gibt allerdings auch Studien, die die Präsenz von Abriebpartikeln in entfernten Lymphknoten sowie Leber und Milz beschreiben [Case, Langkammer, et. al. 1994; Urban, Jacobs, et. al. 2000]

In der Umgebung des Gelenkersatzes werden lymphozytäre und plasmazelluläre Infiltrate regelmäßig beobachtet und beschrieben [Willert 1977; H. G. Willert, G. H. Buchhorn, et. al. 2000].

Die kontinuierliche Beanspruchung der Endoprothese liefert eine fortlaufende Produktion von Abriebpartikeln und damit auch eine ständige Rekrutierung von Monozyten. Letztere führen dann typischerweise zu einer chronischen Entzündung mit der Ausbildung von Granulationsgewebe und nekrotischen Arealen. Im weiteren Verlauf dieser Entzündung und der damit einhergehenden Zytokinausschüttung kommt es zu einer vermehrten Reifung von Osteoklasten bei gleichzeitig einhergehender Hemmung und Untergang der Osteoblasten [Takei, Pioletti, et. al. 2000; Hirashima, Ishiguro, et. al. 2001; Bi, Van de Motter, et. al. 2001; Vermes, Chandrasekaran, et. al. 2001; Greenfield, Bi et. al. 2002; Pioletti, Leoni, et. al. 2002]. Hier ist der Grund für die Stoffwechsellage zu suchen [H. G. Willert, G. H. Buchhorn, et. al. 2000] welche dann wiederum in unmittelbarer Nähe des Implantates zur Osteolyse und damit zur Lockerung desselbigen führen kann [Willert 1977].

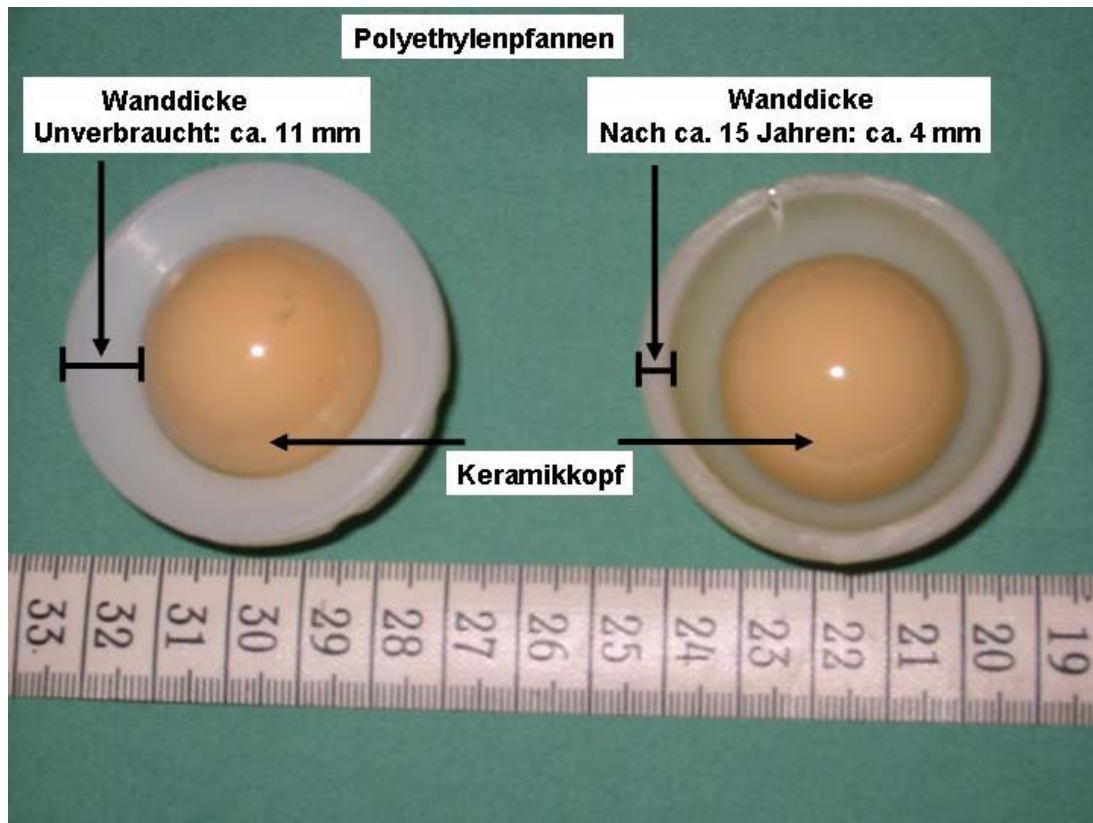


Abb.10: Beispiel für die Wirkung von kontinuierlicher Beanspruchung einer Hüftpfanne- Links die unverbrauchte Hüftpfanne, rechts eine Hüftpfanne nach ca. 15 Jahren Beanspruchung.



Abb.11: Hüft – TEP postoperativ

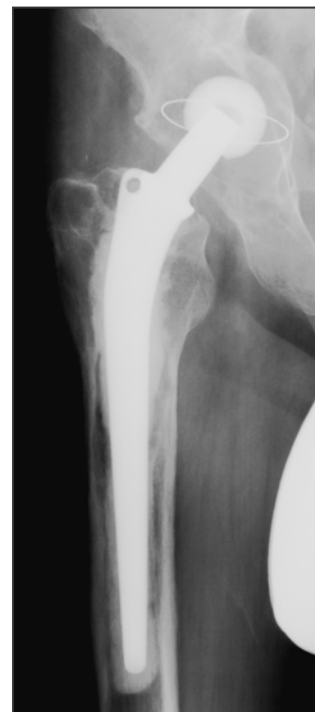


Abb.12: H – TEP 12 Jahre postoperativ:
Die entstandenen Osteolysen sind Folge der Partikelkrankheit

1.1.3.1. Klinisches Beispiel für Metall – Abrieb aus einer Hüfttotalendoprothese:

Männlicher Patient geb. am 15.08.1928

- 1977 Implantation einer Hüft – Totalendoprothese links
- 1984 Implantation einer zementfreien Hüft – Totalendoprothese rechts
- 1997 Nachweis Prothesenlockerung links, Hüftpfanne ist deutlich kranialisiert,
Nachweis von Dezentrierungszeichen links
Hüft – Totalendoprothese rechts o.B.
- 1997 Hüft – Totalendoprothesenwechsel links

Folgender Befund ergab sich Intraoperativ:

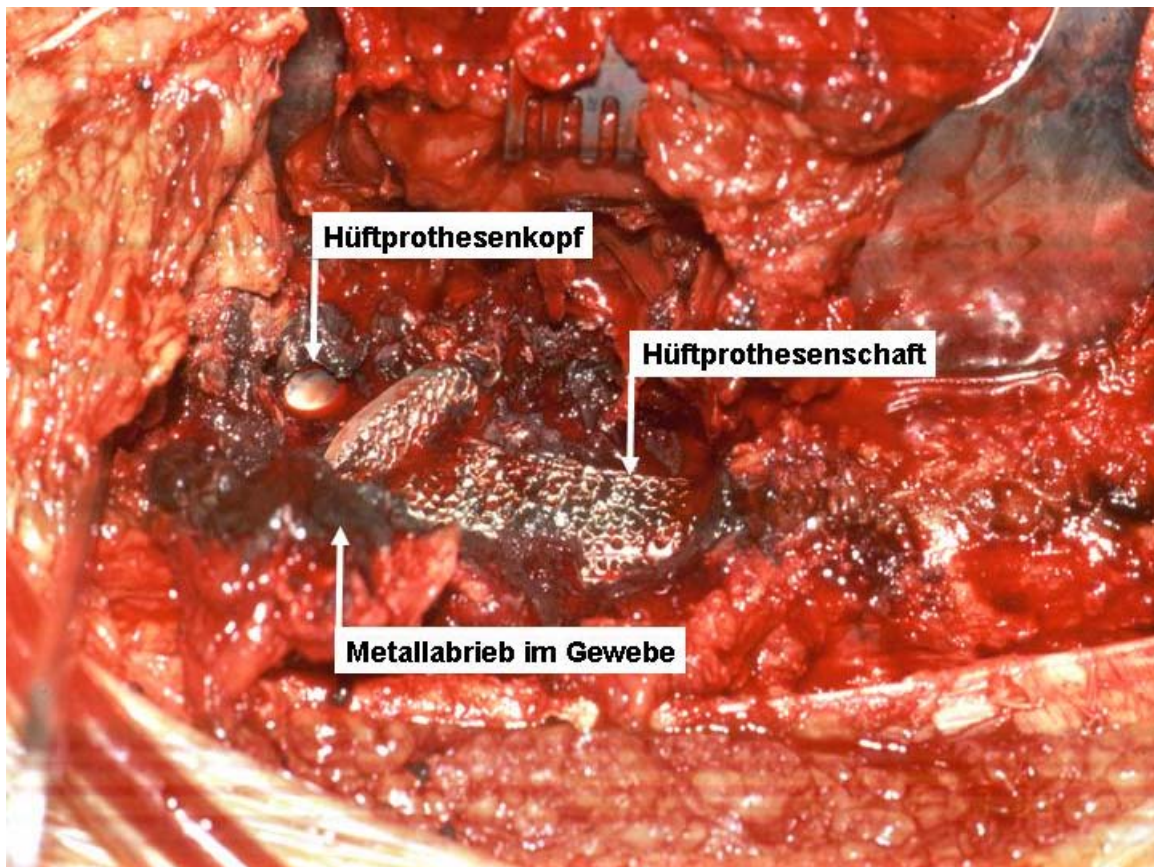


Abb. 13: Intraoperative Darstellung der primär implantierten Hüft – Totalendoprothese. Der Metallabrieb hat das Periartikuläre Gewebe schwärzlich verfärbt

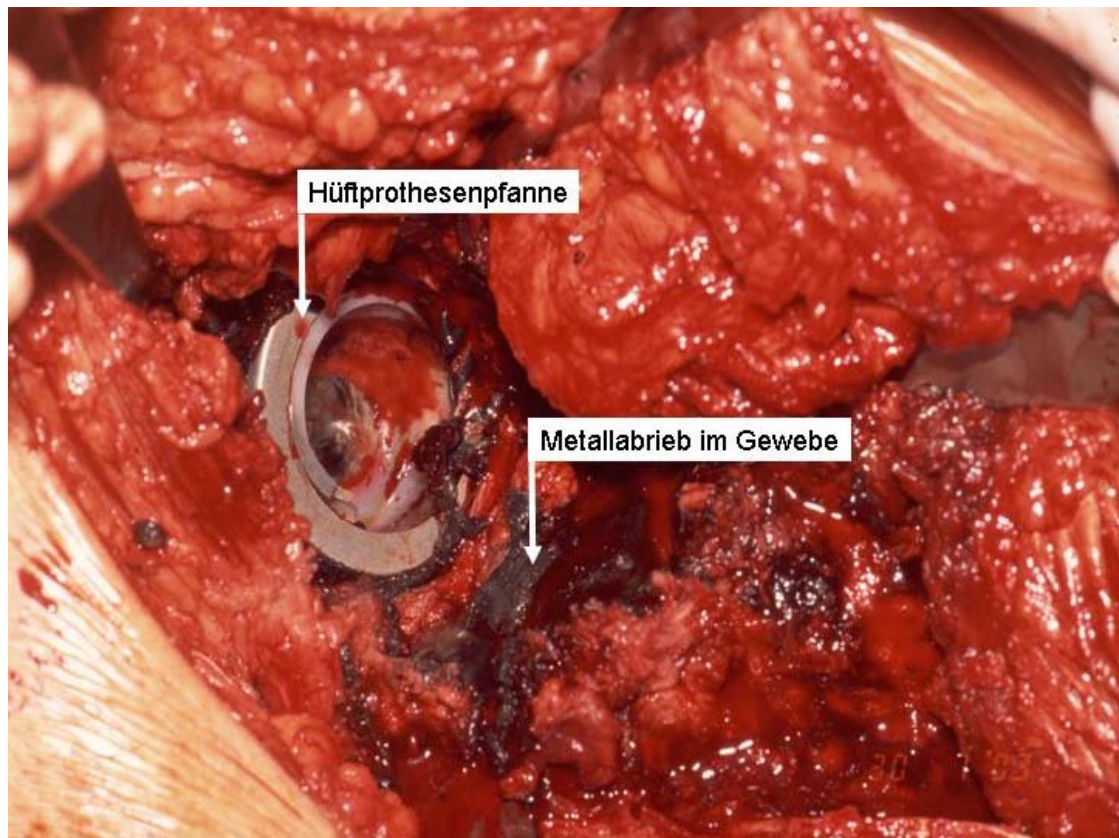


Abb. 14: Intraoperative Darstellung der Hüft – Totalendoprothesenpfanne nach Entfernung des Femurschaftes mit dem, durch Metallabrieb schwärzlich verfärbtem Periartikulären Gewebe.

Histologisch ergab sich folgender Befund:

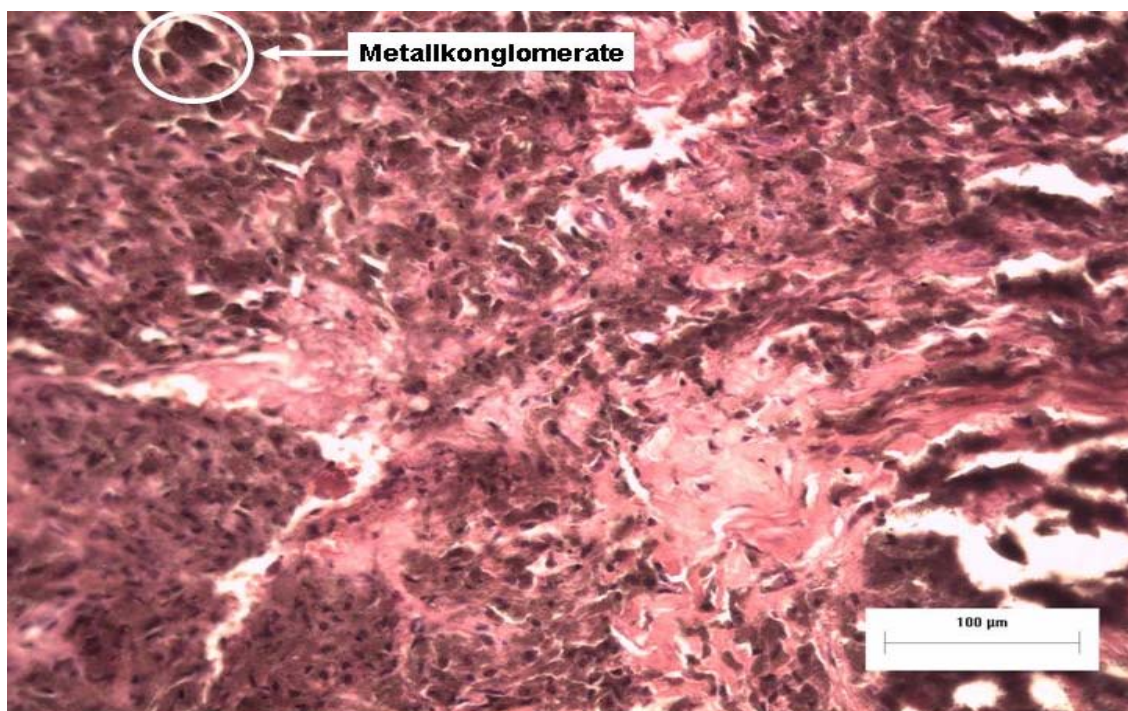


Abb. 15: Gewebe aus dem Pfannengrund in H.E. Färbung. Der Metallabrieb verfärbt das Periartikuläre Gewebe schwarz

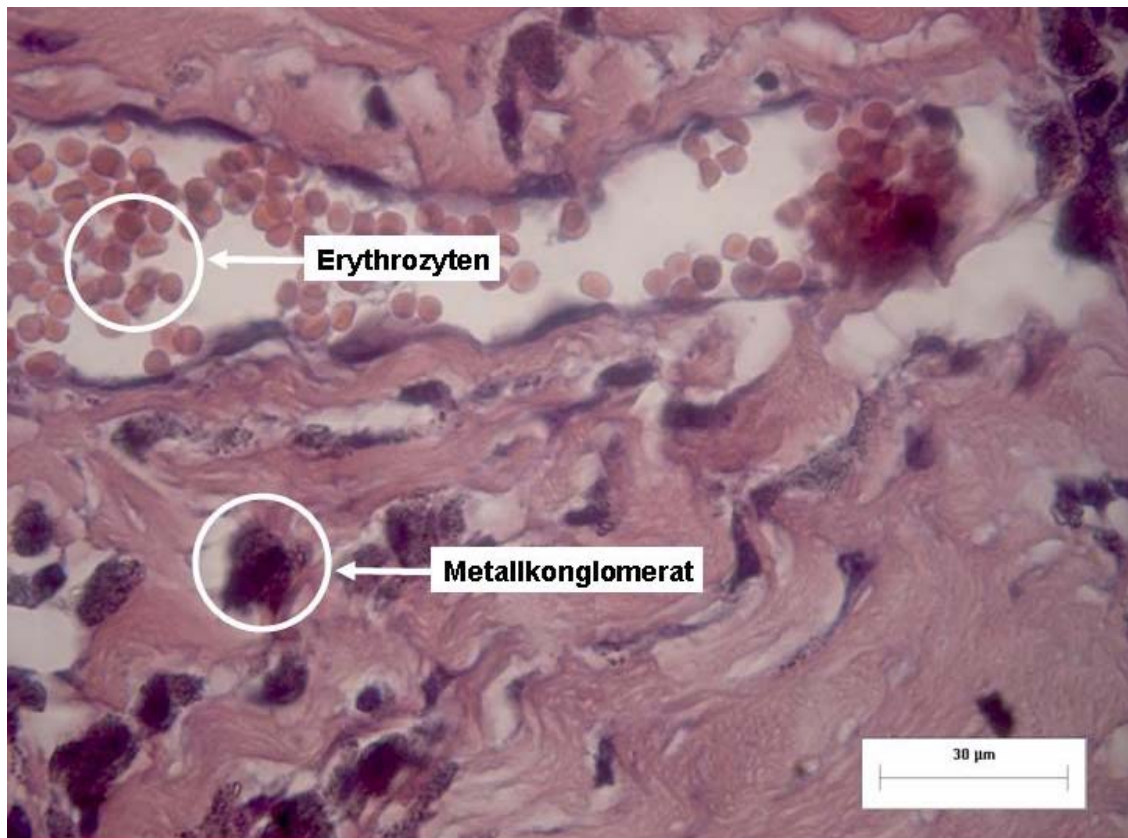


Abb. 16: Gewebe aus dem Grund der Hüft-Endoprothesenpfanne in H.E. Färbung.

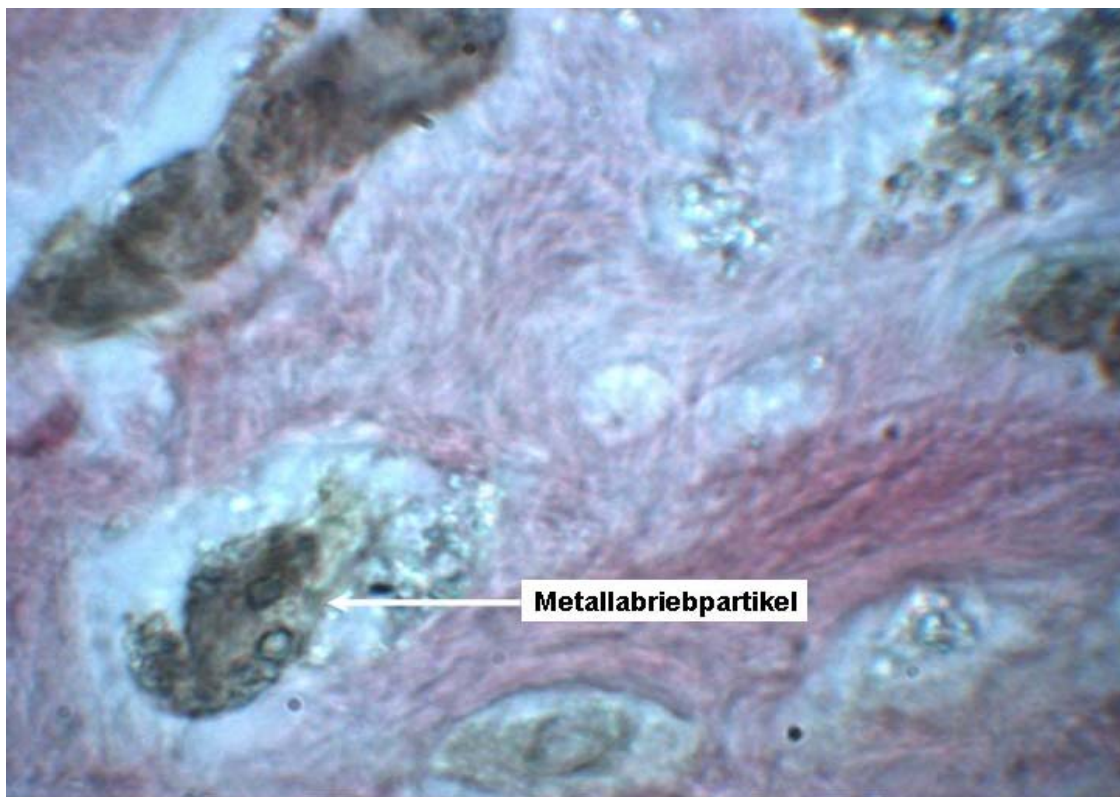


Abb. 17: Gewebe aus der Nähe des Femurschaftes in van Gieson Färbung in 1000facher Vergrößerung mit Öl – Imersion

Weiteres Klinisches Beispiel für die als Metallose bekannte Reaktion des periartikulären Gewebes am Beispiel einer Revisionsoperation nach Primärimplantation einer Knie – Totalendoprothese:

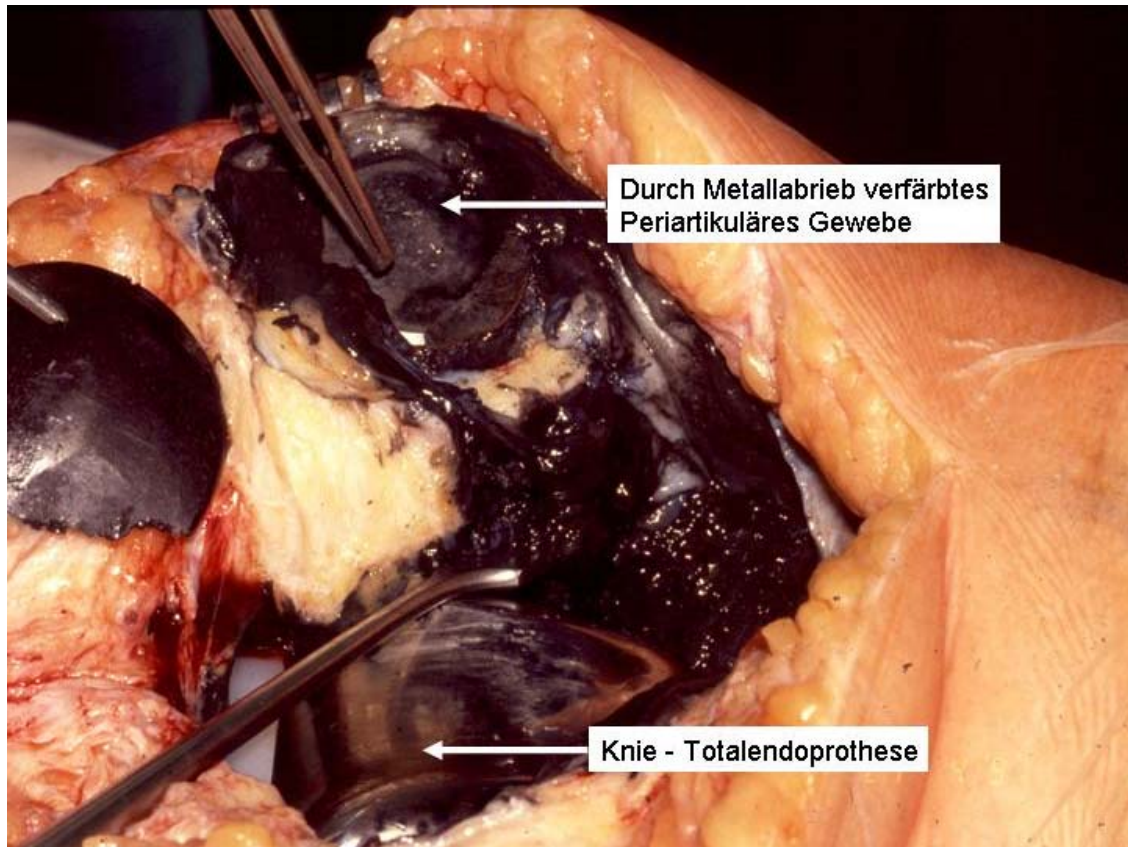


Abb. 18: Intraoperativer Befund bei Revision nach Primärimplantation einer K – TEP mit schwärzlicher Verfärbung des Periartikulären Gewebes.

1.1.4. Zellkultur und Tierversuche

Eines der wesentlichen Probleme in der Testung von Biomaterialien besteht im Ausschluß schädigender Wirkungen der verwendeten Substanz auf den menschlichen Organismus vor dem Einsatz des Werkstoffes im menschlichen Körper.

Die ersten Versuche der Biokompatibilitätsprüfung im Tierversuch wurden bereits in den 30er Jahren durchgeführt [Dixon, Rickert 1933].

Bis heute sind Tierversuchsmodelle ein unverzichtbares Mittel zur Testung von Biomaterialien, welches von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Eigenschaften von Biomaterialien immer noch verwendet wird [Hayashi et. al. 1989, Wilke et. al. 1991].

Schwierig ist allerdings die Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse. Grundsätzlich steht immer die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus im Raum. Es wurde versucht ein Modell zu entwickeln, welches der Situation im Menschen am nächsten kommt.

Das in dieser Studie verwendete Zellkultur – Modell basiert auf einem Konzept welches von Bexter und Mitarbeitern 1976 zur Langzeitkultivierung von Mäuseknochenmark entwickelt wurde. 1980 wurde dieses Zellkulturmodell für die Untersuchung von humanem Knochenmark weiterentwickelt [Hocking WG et. al. 1980, Gartner S et. al. 1980] um dann schließlich von Kalla und Mitarbeitern im Jahre 1991 modifiziert zu werden [Kalla et. al. 1991]. Von der Arbeitsgruppe Kalla wurden dann erstmals die inzwischen entdeckten hämopoetischen Wachstumsfaktoren Interleukin – 3 (IL – 3) und Granulozyten – Makrophagen – Kolonie – stimulierenden – Faktor (GM – CSF) hinzugefügt [Kalla et. al. 1991]. Diese Arbeiten dienten allerdings primär der Erforschung der Hämatopoese, worauf die Arbeitsgruppe Wilke und Mitarbeiter 1991 ein gleichartiges „in vitro“ Zellkultur – Modell vorstellte, welches humanes Knochenmark verwendete, dass steril im Rahmen von Hüft – Total – Endoprothesen (Hüft – TEP) Operationen gewonnen wurde. Dieses Modell sollte nun der Beurteilung der Biokompatibilität von verschiedenen Werkstoffen dienen.

Diese Studie verwendet dieses weiterentwickelte Zellkulturmodell zur Analyse des Zytokinprofils sowie zur Bestimmung der LDH – Aktivität der humanen Knochenmarkszellkultur unter Exposition mit UHMW – PE Partikeln.

1.1.5. Zellarten

Verantwortlich für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse aus Zellkultur ist neben der Auswahl der Zellart auch die Auswahl der Kulturmethode.

Grundsätzlich werden Zellen in der Primärkultur von permanenten Zellen unterschieden.

1. Die Primärkultur stammt von einer Zellart ab, welche sich nach Entnahme aus dem Herkunftsort zum ersten Mal in einer Kultur befindet. Nach Ablauf einer primären Kultivierungsdauer unterliegen diese Zellen einer ersten Passage, d.h. sie werden in eine neue Kulturschale überführt. Diese wird als Sekundärkultur bezeichnet. Nach der Definition von Brauner aus dem Jahre 1989 bilden diese Zellen eine Zelllinie [Brauner A et. al. 1989]. Aus diesen passageren Zelllinien können sich permanente Zelllinien entwickeln, die häufig den Karyotyp und den Differenzierungsgrad der Primärzellen verloren haben [Bourque et. al. 1993].

Aus der Virologie und Mikrobiologie stammt eine weitere Definition der Primärkultur, die Zellen, welche unmittelbar von einem tierischen oder menschlichen Organismus gewonnen wurden, als Primärkultur bezeichnet.

Dem Ort ihrer Herkunft entsprechend können Primärkulturen aus verschiedenen Zellarten bestehen. Durch Trypsin oder mittels des Entzuges von zweiwertigen Kationen wie z.B. EDTA können die Zellen von ihrer Zellkulturschale gelöst werden um dann in einem anderen Behältnis erneut kultiviert werden zu können. Die entstandene Sekundärkultur kann in den meisten Fällen nur noch unter Anwendung bzw. dem Zusatz von Wachstumsfaktoren oder speziellen Substraten weiter passagiert werden [Brandis et. al. 1994].

Der Vorteil der Primärkultur liegt in der, die noch nahezu dem Herkunftsort „in vivo“ entsprechende Zusammensetzung, womit eine äußerst exakte Simulation der „in vivo“ – Verhältnisse erreicht werden kann.

2. Permanente Zelllinien bestehen aus Zellen, die sich unbegrenzt oft teilen können. Diese Art von Zellen entstammt meist aus Tumorgewebe oder durch z.B. Mutation, Transformation, durch onkogene Viren bzw. kanzerogene Chemikalien beeinflusst aus der Zellkultur selbst. Diese permanenten Zelllinien unterscheiden sich von den Zellen der Primärkultur sowohl in morphologischer als auch in funktioneller Hinsicht sehr stark. Die Zellen aus permanenten Zelllinien sind aneuploid, entdifferenziert und sie haben ihre Fähigkeit zur Kontaktinhibition verloren. Die ersten humanen Zellen, die für eine Zellkultur verwendet wurden waren neoplastischen Ursprungs (HeLa – Zellen von einem humanen Zervix – Ca). Bei diesen Zellen zeigte sich, dass sie auch unter identischen Bedingungen sehr große Unterschiede aufwiesen, bezogen auf ihre Sensitivität gegenüber Biomaterialien [Johnson et. al. 1983].

Wenn man die oben beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Zellarten in Betracht zieht und sich überlegt mit welchen ortständigen Zellen die entstandenen Abriebpartikel „in vivo“ in Kontakt treten, zeigt sich, dass die humane Knochenmarkszellkultur die Kultur der ersten Wahl ist. Wenn man die Erkenntnisse aus jüngeren Studien mit primären ortständigen Knochenmarkszellen zur Frage der Biokompatibilitätsprüfung hinzu zieht, erkennt man, dass diese Zellkultur höchsten Ansprüchen genügt [Wilke et. al. 1991, 1993, 1999, 2000].

Ein weiterer Vorteil, den die humane Knochenmarkszellkultur bietet ist die Tatsache, dass sie neben entdifferenzierten Zellen auch undifferenzierte Zellen beinhaltet. Diese Zellen besitzen nach der Zugabe von Abriebpartikeln immer noch die Potenz sich in die eine oder andere Richtung zu differenzieren. So könnte sich zum Beispiel im Laufe der Beobachtung der Zellkultur eine Veränderung der Zellpopulation immunkompetenter Zellen zeigen.

Gleichzeitig muss man bedenken, dass bei Patienten mit Hüft-Totalendoprothesen die Funktion der Abwehrzellen geschwächt ist, und es bei diesen Patienten zu einer Allergisierung kommen kann. Eine humane Knochenmarkszellkultur, die auch immunkompetente Zellen enthält, kann dazu beitragen, Ergebnisse in dieser Richtung zu erzielen.

Zuletzt muss bedacht werden, dass die Osteoblasten eine entscheidende Rolle bei der Integration der Implantate spielen und schließlich die Verankerung der Prothese ermöglichen.

1. 2. Entzündungsreaktionen

Histologische Untersuchungen von periprotetischem Gewebe zeigen die Merkmale einer chronischen Entzündung. [H. – G. Willert, G. H. Buchhorn et. al. 2000]

Hierzu gehört vor allen Dingen die Infiltration von Histiozyten / Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen. Morphologisch können drei unterschiedliche Typen einer chronischen Entzündung unterschieden werden, der granulomatöse Typ, der lymphozytäre Typ und der granulierende Typ, [W.Böcker, H. Denk, et. al. 1997].

Granulomatöse Entzündungen werden in der Regel bei schwer abbaubaren Fremdkörpern gefunden. Beispiele hierfür sind sowohl toxische (Asbest, Silikon), als auch nicht toxische (Kohle, Plastik) Fremdstoffe. Mikroorganismen wie Mykobakterien, Listerien und Leishmanien rufen ebenfalls solche spezifischen Entzündungsreaktionen hervor.

Es kommt hierbei zunächst zu einer unspezifischen Abwehrreaktion mit der Einwanderung von Monozyten und deren Aktivierung zu Makrophagen. Hieraus wird das primäre Fremdkörpergranulom gebildet, welches sich ohne die Beteiligung des Immunsystems weiterentwickelt [W.Böcker, H. Denk, et. al. 1997].

Kennzeichnend für die chronisch granulierende Entzündung ist die Präsenz von Monozyten / Makrophagen (Resorptionszone), Granulationsgewebe mit Fibroblasten und Kapillarsprossen (reparative Zone) und reifem kollagenem Bindegewebe.

Es lassen sich drei Formen unterscheiden:

1. Die xanthomatöse Form zeichnet sich aus durch den Reichtum an Schaumzellen (Phagozytose von Fetten durch die Makrophagen) und ist zum Beispiel bei Pyelonephritiden und Fettgewebsnekrosen zu finden
2. Die hypertrophische granulierende Entzündung zeichnet sich aus durch eine verstärkte Bildung von Granulationsgewebe (Granulationspolypen) und eine verstärkte Narbenbildung (Keloide)
3. Bei der fibrosierend – sklerosierenden Entzündung findet sich eine verstärkte Proliferation von Fibroblasten, die zur Bildung von hyalinem Narbengewebe führt.

Zu beobachten ist sie beim sog. Kapselfibrosesyndrom nach einer Implantation von von Mammaprothesen aus Silikon.

Typischerweise sind lymphozytäre Reaktionen bei Autoimmunerkrankungen zu finden. Als Beispiele seien hier genannt die Hashimoto Thyreoditis, die Sklerodermie oder rheumatische Erkrankungen.

Die Gemeinsamkeit zwischen den Rheumatischen Erkrankungen und den Prozessen die sich bei Knochenmarkszellen abspielen, die mit Abriebpartikeln in Kontakt kommen liegt darin, dass es in beiden Fällen zu einer Knochendestruktion kommt, weswegen die Erwartungshaltung gegenüber Polyethylen dahingeht, dass man mit einem signifikanten Abbau von Knochen rechnet.

Die angesprochene chronische Entzündung ist ein Ausdruck für eine Autoreaktivität gegen körpereigene Gewebebestandteile. Neben lymphozytären Infiltraten gehen sie mit einer Parenchymdestruktion und einer Vernarbung einher.

Bei der aseptischen Prothesenlockerung spielt die granulierende Entzündung keine Rolle.

1. 3. Zytokine

Zytokine sind Peptide mit einer Größe von 10 kDa bis 25 kDa, die von einem breiten Spektrum von Zellen gebildet werden. Bei der Immunantwort und bei Reperaturvorgängen wirken sie als Wachstumsfaktoren und als Botenstoffe. Die heute bekannten Zytokine lassen sich entsprechend ihrer Funktion in verschiedene Gruppen einteilen – Z.B. Interleukine, Chemokine, Interferone, Tumor – Nekrose – Faktoren, Kolonie Stimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren [S.K. Durum & K. Muegge 1998].

Zytokine wirken bereits in picomolaren Konzentrationen, haben eine Halbwertszeit von Sekunden bis Minuten und wirken vor allen Dingen auto – und parakrin, teilweise allerdings auch systemisch. Sie sind in der Lage, bei mehreren Zelltypen gleiche oder unterschiedliche Reaktionen hervorzurufen (Pleiotropismus) [R. M. Zinkernagel 1998].

Entzündungsfördernd wirken z. B.: IL – 1, IL – 6, IL – 8, TNF - α , TGF – β

Entzündungshemmend wirken z.B.: IL – 10, IL – 13, TGF – β

Hämatopoiesefördernd wirken z.B.: G – CSF, M – CSF, GM – CSF, IL – 3, IL – 5, IL – 7 [R. M. Zinkernagel 1998]

Zahlreiche Untersuchungen des Prozesses der aseptischen Prothesenlockerung richteten ihr Augenmerk besonders auf die proinflammatorischen Zytokine IL – 1 β und IL – 6 sowie TNF – α . Die werden unter anderem von aktivierten Makrophagen synthetisiert und sind bei der akuten Entzündung im lokalen Bereich sowohl für die Gewebsreaktion verantwortlich, als auch systemisch für den Fieberanstieg. [S.K. Durum & K. Muegge 1998].

1. 3. 1. Interleukin 1 β

Interleukin wurde ursprünglich von Gery und Waksman im Jahre 1971 beschrieben als ein von Makrophagen abstammender „Lymphozyten – aktivierender Faktor“ (LAF) [Gery, Gershon, et al. 1971]. Spätere Studien fanden dann biochemische sowie strukturelle Übereinstimmungen mit anderen, zu diesem Zeitpunkt erst teilweise erforschten Mediatoren (Endogenes Pyrogen, Osteoklasten aktivierender Faktor, u.a.). 1979 wurde dieses Protein dann in Interleukin 1 umbenannt [Krakauer & Oppenheim 1998].

Seit dem Jahre 1984 sind zwei unterschiedliche Proteine mit IL – 1 Eigenschaften bekannt, IL – 1 α und IL – 1 β . Die Gene für beide Proteine befinden sich auf dem langen Arm des Chromosom 2. Produziert werden sie hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen, wobei der Anteil an IL – 1 β überwiegt. Induziert werden kann die Produktion unter anderem durch GM – CSF. IL – 1 β wird freigesetzt entweder durch Exozytose, mittels Transportproteinen oder bei Zelluntergang [Flad & Gerns 1997]. Weitere Stimuli für die Produktion von IL – 1 β stellen mikrobielle Stoffwechselprodukte und Zellbestandteile dar sowie zellschädigende Noxen, wie UV – Licht oder Uratkristalle, als auch andere Entzündungsmediatoren, wie TNF – α und IL – 1 selbst [S.K. Durum & K. Muegge 1998].

Die Funktion liegt in der Verstärkung der unspezifischen, frühen Entzündungsreaktion, hier einhergehend mit einer verstärkten Durchblutung, der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch Ausschüttung von Chemokinen, sowie der Expression anderer Zytokine wie zum Beispiel IL – 6, TNF – α und GM – CSF durch Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen und Fibroblasten.

Die Knorpel – und Knochenresorption [Gowen, Wood, et al. 1983; Lorenzo, Sousa, et al. 1987] wird durch IL – 1 induziert, was bei chronisch entzündlichen Erkrankungen

wie der Rheumatoiden Arthritis langfristig zum Verlust der Knochensubstanz beitragen kann [S.K. Durum & K. Muegge 1998; Dinarello 1985].

Als endogenes Pyrogen aktiviert IL – 1 systemisch das Fieberzentrum im Hypothalamus und stimuliert im Knochenmark die Hämatopoese durch zum einen die direkte Reifung neuer myeloider und lymphoider Vorstufen aus pluripotenten Stammzellen [Henney, 1988] und zum anderen auch durch die verstärkte Synthese anderer Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel IL – 3, GM – CSF und M – CSF in den Stromazellen des Knochenmarks [Flad & Gemsa, 1997].

Zusätzlich fördert IL – 1 das Wachstum, die Reifung und die Aktivierung von B – und T – Lymphozyten. Ebenso wurde ein positiver Effekt auf Antigenpräsentierende Zellen beschrieben [Aiello, Longo, et. al. 1990]

Die Aktivität von IL – 1 konnte in vitro durch Hydrocortison und PGE₂ gehemmt werden [Flad & Gemsa 1997].

1. 3. 2. Interleukin 6

Das Interleukin 6 ist ein multifunktionelles Zytokin, das ein breites Wirkspektrum auf verschiedene Zielzellen aufweist. Synthetisiert wird es vor allem von Makrophagen und T – Zellen, allerdings auch von Fibroblasten, Endothelzellen und anderen Zellarten. IL – 6 hat ein Molekulargewicht von 21,5 – 28 kDa und besteht aus 184 Aminosäuren. Das Gen für IL – 6 ist auf dem Chromosom 7 zu finden [Flad & Gemsa 1997].

Die Ausreifung von B – Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Zellen sowie die Differenzierung und das Wachstum von T – Lymphozyten werden durch IL – 6 induziert.

Die Teilung primitiver hämatopoetischer Stammzellen wird durch IL – 6 beschleunigt ebenso wie die Erhöhung der Sensibilität selbiger gegenüber anderen Wachstumsfaktoren wie GM – CSF und IL – 3. Hiermit gehört IL – 6 zu den sogenannten synergistischen Faktoren der Hämatopoese [T.Matsuda & T.Kishimoto 1998; Jansen, Kluin – Nelemans, et. al. 1992; Okano, Suzuki, et. al. 1989; Suzuki, Okano, et. al. 1989].

Ebenso wie IL – 1 und TNF – α ist IL – 6 an akuten Entzündungsreaktionen beteiligt. Während IL – 1 und TNF – α die Synthese von IL – 6 steigern, unterdrückt IL – 6 wiederum die Produktion von IL – 1 und TNF – α in den Makrophagen. In den B – Zellen wird die Synthese von IgM – Antikörpern durch IL – 6 induziert, während die

Empfindlichkeit von T – Zellen gegenüber IL – 2 (T – Zell – Wachstumsfaktor) erhöht wird, womit die Proliferation von T – Lymphozyten angeregt wird. Außerdem wird die Aktivierung anderer Zellen über den T – Zell – Rezeptor verstärkt.

IL – 6 wirkt genauso wie IL – 1 negativ auf den Knochenstoffwechsel und führt von daher über eine verstärkte Proliferation von Osteoklasten zum Knochenabbau [Jilka, Hangoc, et. al. 1992; Ishimi, Miyaura, et. al. 1990].

1. 3. 3. Tumor Nekrose Faktor – α

1975 wurde der Begriff Tumor Nekrose Faktor (TNF) erstmals von Carswell et. al. benutzt [Carswell, Old, et. al. 1975], nachdem vorher bereits 1866 Busch, später dann 1888 Bruns und schließlich 1893 Coley den Untergang von Tumorzellen durch die Behandlung mit bakteriellen Toxinen oder eine Infektion beschrieben hatte.

TNF – α kann von den meisten Zellen des Körpers gebildet werden, darunter auch Monozyten / Makrophagen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen, T – und B – Lymphozyten, und gehört zu den wichtigsten Entzündungsmediatoren.

Es besteht aus 157 Aminosäuren und hat eine Molekulargewicht von 17 kDa. Das Gen für TNF – α befindet sich auf dem Chromosom 6 [Flad & Gernsma 1997].

Die Synthese von TNF – α wird durch virale und bakterielle Antigene ebenso stimuliert wie durch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine wie zum Beispiel IL – 1, GM – CSF, CSF – 1 und TNF – α selbst.

TNF – α reguliert die Proliferation und die Funktion von T – und B – Zellen, fördert die Differenzierung von Monozyten, steigert die Myelopoese, steigert die phagozytäre Aktivität von Granulozyten und Makrophagen und induziert die Freisetzung von IL – 1 und IL – 6 [L.Rink 1998]. Durch eine verstärkte Bindung an Endothelzellen wird außerdem die Extravasation von Granulozyten und T – Lymphozyten gefördert.

Auf den Knochenstoffwechsel wirkt TNF – α ähnlich wie IL – 1 und IL – 6. Während die Osteoklastenaktivität zunimmt, wird die Knochenneubildung gehemmt. Auch der Knorpel wird durch die verstärkte Synthese von Kollagenase in den verschiedenen Zellen wie zum Beispiel den Fibroblasten angegriffen [Bertolini, Nedwin, et. al. 1986; Flad & Gernsma 1997].

Neben anderen Zytokinen spielt TNF – α eine Rolle in der Genese des Endotoxinschocks und bewirkt systemisch die Entstehung von Fieber.

1. 4. Hämatopoese und Wachstumsfaktoren

Die Reifung der zellulären Bestandteile des Blutes findet überwiegend im Knochenmark statt. Gemeinsamer Ausgangspunkt sind pluripotente Stammzellen, aus denen dann entweder neue Stammzellen hervorgehen oder Vorläuferzellen der verschiedenen Differenzierungsreihen.

Zytokine ist der Sammelbegriff für Faktoren, die die Dynamik der Zellreifung positiv oder negativ beeinflussen. Die meisten Zytokine wirken auf mehrere Zellarten mit gleichen oder unterschiedlichen Effekten – also pleiotrop.

Zytokine spielen ebenso wie Kolonie – stimulierende – Faktoren in der Hämatopoese eine Rolle. Eine Übersicht über die Regulation der Hämatopoese gibt die Abbildung

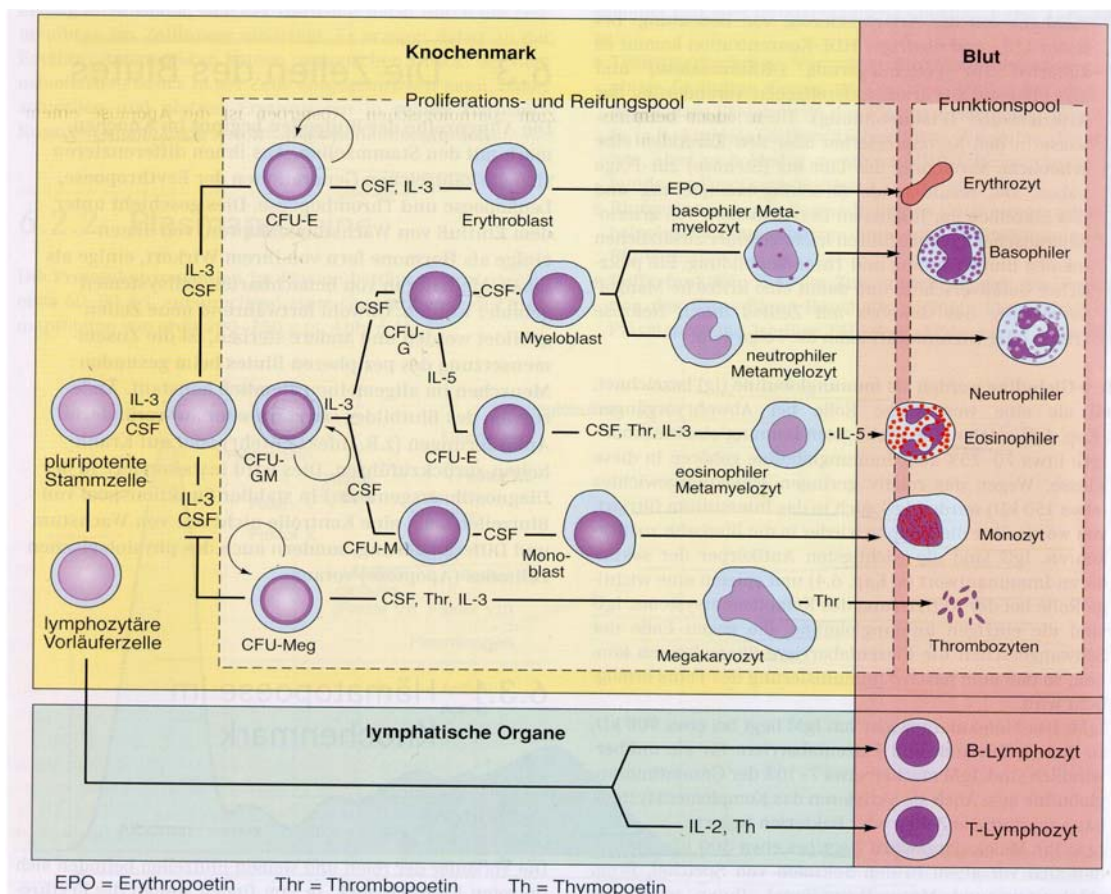


Abb. 19: Schematische Darstellung der Hämatopoese: Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle Differenzierungsstufen dargestellt.

1. 4. 1. Granulopoese

Der Ort der Granulopoese ist das Knochenmark. Man unterscheidet einen Teilungs – , einen Reifungs – und einen Speicherpool [Begemann H. & Raststetter J. 1993].

Aus der pluripotenten Stammzelle entsteht zunächst die multipotente CFU – GEMM (CFU = colony forming unit), aus der sich dann noch die vier Zellreihen der Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten differenzieren können.

Der Myeloblast als erste morphologisch identifizierbare Zelle der granulozytären Zellreihe entwickelt sich über weitere bi – und monopotente Vorläuferzellen (CFU – GM, CFU – G). Aus diesem Myeloblast differenzieren sich die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren der Granulopoese sind neben GM – CSF, G – CSF und IL – 3. IL – 3 wirkt im Gegensatz zu den anderen genannten bereits auf Stammzellebene.

Es wird vermutet, dass auch Interleukin 1 eine stimulierende Wirkung auf die Stammzellen hat [Begemann H. & Raststetter J. 1993]

Die Bildungsrate der Granulozyten ist mit 1×10^9 Zellen / kg pro Tag entsprechend der kurzen Überlebenszeit der Granulozyten im menschlichen Organismus von durchschnittlich 1 – 3 Tagen hoch. Die Reifungsdauer eines Granulozyten beträgt zwischen 5,6 und 13 Tagen, im Mittel 10 – 12 Tage [Begemann H. & Raststetter J. 1993].

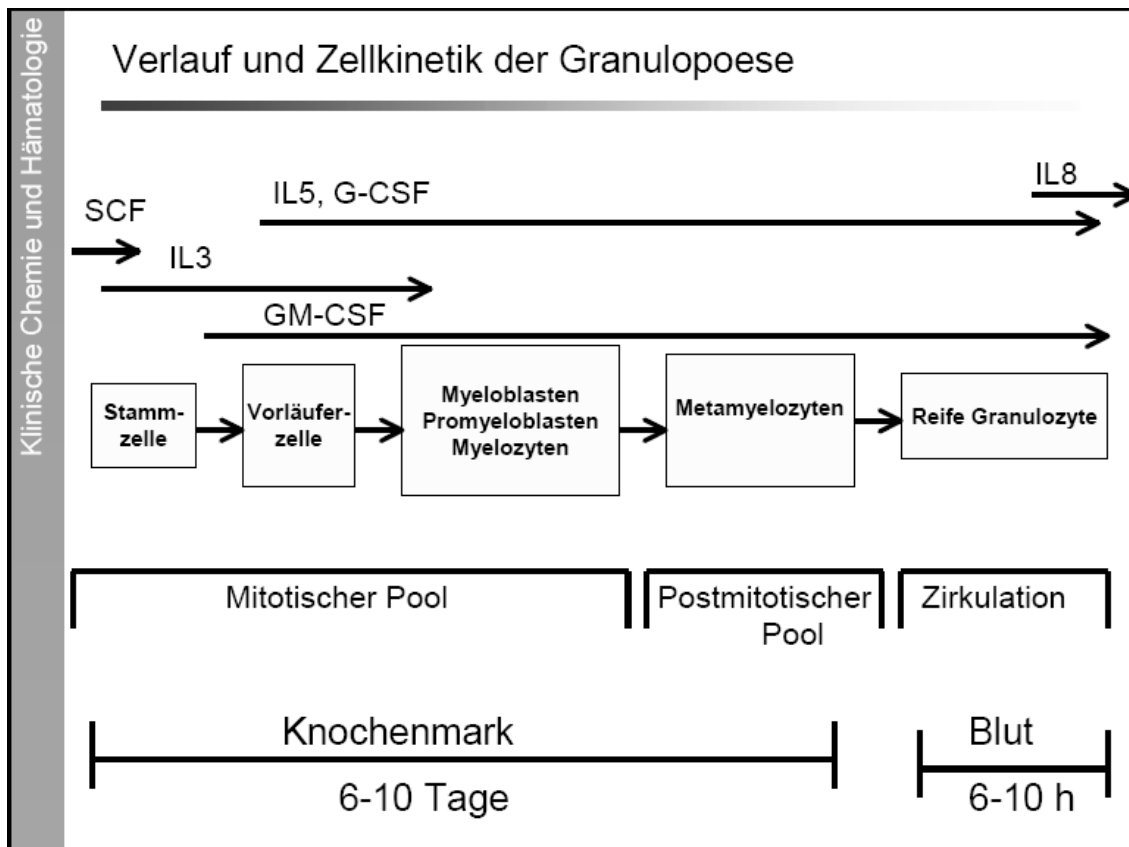


Abb. 20: Darstellung des Verlaufes und der Zellkinetik der Granulopoese

(Aus: Klaus Dörner Klinische Chemie und Hämatologie)

1. 4. 2. Monozytäres System

Eine evolutionär frühe Form der Infektabwehr sind die mononukleären phagozytischen Zellen. Aufgabe dieser Zellen ist neben der unselektiven Phagozytose von Fremdkörpern und Krankheitserregern die Modulation der spezifischen Immunabwehr durch Antigenpräsentation und die Produktion von Zytokinen. Die Phagozytose von Fremdmaterial kann unter Umständen zum Untergang eines Makrophagen führen, der dann von einer anderen Zelle aufgenommen werden kann, ohne dabei selbst beschädigt zu werden („Makrophagenkannibalismus“).

Über die erwähnten Vorstufen CFU – GEMM, CFU – GM und CFU – M und unter dem Einfluß der Wachstumsfaktoren IL – 3, GM – CSF und M – CSF entwickeln sich die Promonozyten als erste morphologisch identifizierbare Vorläufer der Makrophagen. Haben sie das Stadium der Monozyten erreicht, wandern sie aus dem Knochenmark in die Blutbahn ein, um dort für kurze Zeit zu zirkulieren, bevor sie dann ins Gewebe übertreten, um zu Makrophagen zu transformieren.

Die Reifungszeit beträgt vom Stadium des bipotenten CFU – GM bis zum Monozyten 6 Tage. Nach weiteren 1 – 3 Tagen erfolgt die Emigration aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe und die Ausdifferenzierung zum Makrophagen [Nerl 1993].

Durch bereits milde Entzündungsreize kann sich allerdings diese Zeitspanne erheblich verkürzen, wodurch der Monozytenpool im Blut rasch zunimmt.

Durch Glukokortikoide wird allerdings die Proliferation und Emigration der Monozyten aus der Blutbahn deutlich gehemmt.

1. 4. 3. Lymphopoese

Die spezifische Komponente des Immunsystems sind die Lymphozyten. Während die T – Lymphozyten bereits ab dem Stadium der Stammzelle im Thymus reifen, werden B – Zellen mindestens bis in das Stadium des Pro – B – Lymphozyten im Knochenmark produziert.

In den sekundären lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten und dem Mukosa – assoziiertem lymphatischen Gewebe (MALT) geschieht dann die endgültige Differenzierung.

Hier spielen andere Wachstumsfaktoren eine Rolle als bei der Granulopoese und der Monozytopoese. Für die T – Zellentwicklung zum Beispiel wird unter anderem IL – 2 und Thymopoetin benötigt, während für die Reifung der B – Zellen IL – 7 von Bedeutung ist, welches in den Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird [D.C. Linch 1998].

Auch Entzündungsmediatoren wie IL – 1, IL – 6, TNF und IFN – γ haben vor allem auf die letzten Schritte der Differenzierung der Lymphopoese ihren Effekt.

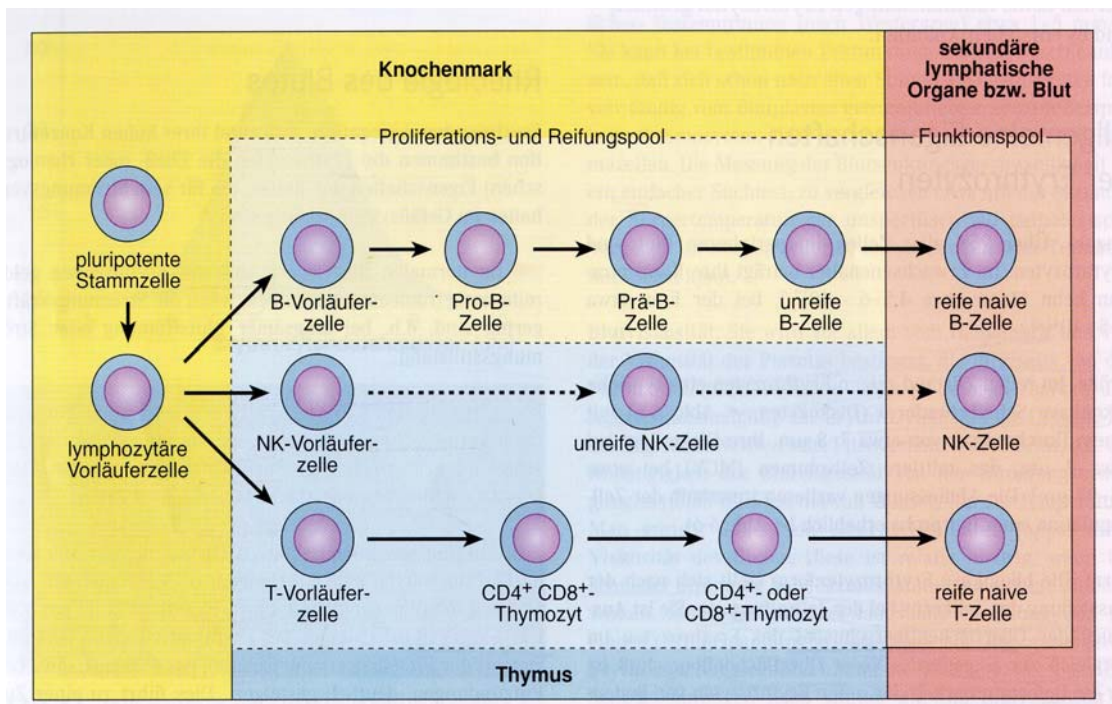


Abb.21: Stark vereinfachte Darstellung der Lymphozytenreifung

1. 4. 4. Interleukin 3 (Multi – CSF)

Interleukin 3 (IL – 3) ist ein Polypeptid welches ein Molekulargewicht von 20 – 26 kDa aufweist und aus 133 Aminosäuren besteht. Strukturell weist es große Ähnlichkeit mit GM – CSF auf. Ebenso wie GM – CSF ist das Gen für IL – 3 auf dem langen (q –)Arm des Chromosom 5 lokalisiert.

Von aktivierten T – Lymphozyten gebildet, fördert IL – 3 im Knochenmark besonders die Reifung sowie das Wachstum von Mastzellen [Nabel, Galli, et. al. 1981].

Neben den T – Lymphozyten wird IL – 3 ebenso von den Natürlichen Killerzellen, in geringen Mengen von aktivierten Mastzellen in der Mukosa und im Bindegewebe sowie auch von den eosinophilen Granulozyten gebildet.

So wie GM – CSF ist auch IL – 3 im Patientenserum derzeit noch nicht messbar, was annehmen lässt, das beide Wachstumsfaktoren lokal produziert werden und eine parakrine Wirkung haben [P.S. Crosier & K.E. Crosier 1998]

IL – 3 stimuliert die Produktion von Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, erythroiden Vorläuferzellen und Megakaryozyten. Zusätzlich steigert es die Aktivität von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und es moduliert die Funktion von reifen Monozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen [D.C. Linch 1998]. Die Stimulation von primitiven Stamm – und

Vorläuferzellen durch IL – 3, in Kombination mit dem synergistisch wirkenden Wachstumsfaktor GM – CSF hat eine maximale Aktivierung der Myelopoese zur Folge [J.W. Schrader 1998].

Heutzutage ist davon auszugehen, dass IL – 3 auf fast alle Zelllinien, die von den hämatopoetischen Stammzellen ausgehen, einen Effekt hat [J.W. Schrader 1998]. Ausgenommen hiervon sind nur die T – Lymphozyten.

1. 4. 5. Granulozyten – Makrophagen – Kolonie – Stimulierender – Faktor (GM – CSF)

GM – CSF fördert die Differenzierung, funktionelle Aktivität und die Proliferation von hämatopoetischen Zellen.

T – Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und endotheliale Zellen bilden GM – CSF. Der humane Wachstumsfaktor GM – CSF hat ein Molekulargewicht von 23 kDa und besteht aus 127 Aminosäuren. Der Genort ist auf dem langen Arm des Chromosom 5 zu finden, genauso wie der Genort von IL – 3 und anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren dort zu finden ist. GM – CSF bewirkt bei den Vorläuferzellen von Granulozyten, Megakaryozyten, Monozyten und Erythrozyten eine Proliferation und Differenzierung [Steward 1993]. Weiterhin verstärkt es durch die Induktion der Sekretion von IL – 1 und der Transkription des TNF – α Gens die Funktion reifer Effektorzellen bei der Immunantwort [Flad & Gemsa 1997]. Bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten verlängert GM – CSF die Lebensdauer und erhöht die metabolische Aktivität. Bei Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten sowie Makrophagen werden die Phagozytoseeigenschaften, sowie deren Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen verstärkt [P.S. Crosier & K.E. Crosier 1998].

GM – CSF fördert in Kombination mit Erythropoetin die Erythropoese und in Anwesenheit von IL – 2 wirkt er als Promotor für das Wachstum verschiedener T – Zelllinien.

Der klinische Einsatz von GM – CSF ist unterstützend bei einer Chemotherapie, in der Behandlung von Infektionen und Tumoren bei AIDS – Patienten und nach Knochenmarkstransplantationen.

1. 5. Knochenstoffwechsel

Durch das Gleichgewicht zwischen Knochenneubildung und Knochenresorption wird im Knochen dessen Stabilität gewährleistet. Übernommen werden diese Aufgaben von den Osteoblasten und Osteoklasten. Die Osteoklasten gehen aus der sogenannten Colony – Forming – Unit der Granulozyten / Makrophagen (CFU – GM) heraus hervor [Hagenaars, Kawilaran – de Haas, et. al. 1991; Hattersley, Kerby, et. al. 1991; Kurihara, Chenu, et. al. 1990]. Die Osteoblasten gehen aus der CFU der Fibroblasten (CFU – F) hervor [Owen 1985; Owen & Friedenstein 1988].

Einen Einfluß auf die Reifung von Osteoblasten und Osteoklasten haben die Wachstumsfaktoren. Der Makrophagen – Colony – Stimulating – Factor (M – CSF) oder CSF – 1 ist für die Ausreifung von Osteoklasten verantwortlich. Bei Mäusen kann ein Gendefekt des CSF – 1 Gens durch einen Mangel an Osteoklasten zum klinischen Bild der Osteoporose führen [Marks & Lane 1976; Yoshida, Hayashi, et. al. 1990].

Das Wachstum und die Differenzierung pluripotenter Vorläuferzellen wird durch IL – 3 oder Multi – CSF stimuliert. Damit ist IL – 3 für die Ausreifung von Osteoklasten in den frühen Entwicklungsstadien ebenfalls von Bedeutung.

Tierversuche haben allerdings keinen Hinweis für einen direkten Einfluss von IL – 3 auf die Resorption von Knochensubstanz ergeben [Barton & Meyer 1990]. Für GM – CSF gilt ähnliches. Der Haupteffekt liegt hier in der Stimulation hämatopoetischer Vorläuferzellen. In bisherigen Zellkulturexperimenten führten weder IL – 3, noch GM – CSF alleine zur Differenzierung von Osteoklasten [Hattersly, Owens, et. al. 1991]. Bisher konnte ein direkter Einfluss von GM – CSF und IL – 3 auf die Proliferation oder Inhibition von Osteoblasten nicht nachgewiesen werden.

Eine Reihe von Interleukinen, welche bei der Regulation von Immunreaktionen und bei der Hämatopoese eine Rolle spielen, haben ebenfalls ihre Wirkung auf den Knochenstoffwechsel.

IL – 1 hat direkten Einfluß auf die Knochenresorption durch die Aktivierung von Osteoklasten [Dewhirst, Stashenko, et. al. 1985] und einen indirekten Einfluss über die Induktion der Prostaglandinsynthese [Akatsu, Takahashi, et. al. 1991], welche auch zu einem Abbau der Knochensubstanz führt. IL – 1 scheint ebenfalls eine Rolle bei den fokalen Osteolysen durch Myelome zu spielen [Carter, Merchav, et. al. 1990].

Ebenso wie IL – 1 stimuliert auch TNF – α die Resorption von Knochen [Lorenza, Sousa, et. al. 1987; Bertolini, Nedwin, et. al. 1986]. Sowohl in

Knochenmarkszellkulturen als auch im Knochengewebe bewirkt TNF – α eine Vermehrung der Osteoklasten [Johnson, Boyce, et. al. 1989; Pfeilschifter, Chenu, et. al. 1989], was dann wiederum zu einem vermehrten Knochenabbau führt. Auch Interleukin – 6 führt zu einem verstärkten Abbau der Knochensubstanz [Jilka, Hangoc, et. al. 1992]. Der Haupteffekt zusammen mit IL – 3 und IL – 1 ist, die Aktivierung der Vorläuferzellen von Osteoklasten [Roodman 1992].

In verschiedenen Zellkulturstudien ist beschrieben worden, dass Makrophagen nach Partikelkontakt die Eigenschaften von Osteoklasten entwickeln und in der Lage sind Knochen zu resorbieren [Pandey, Quinn, et. al. 1996].

1. 6. Fragestellung

Das Ziel dieser Studie war es, zu zeigen das industriell gefertigte UHMW – PE Partikel zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von Mediatoren führen, die proinflammatorisch und osteolytisch wirken, was wiederum zu einer Lockerung von Endoprothesen und einer erhöhten Rezidivrate führt.

Der humanen Knochenmarkszellkultur, die in unserem Labor vor Jahren eingeführt und standardisiert wurde, kam hierbei besondere Bedeutung zu [Wilke et. al. 1991, 1992, 1993, 1995, 1999, 2000].

Das Knochenmark ist der Ort der Immunantwort auf die Exposition mit Substanzen die lokal oder systemisch wirken. Die lokale Reaktion des humanen Knochenmarks auf den Kontakt mit Abriebpartikeln kann mit einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen einhergehen, welche durch Phagozytose der Abriebpartikel bedingt wird. Hierdurch kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen dem Knochenaufbau und Knochenabbau zugunsten des Knochenabbaus. Zusätzlich kann es zu einer Veränderung in der Zelldifferenzierung der Knochenmarkszellkultur kommen. Um etwaige Therapieansätze ableiten zu können, sollte auf diesen Umstand besonderen Wert gelegt werden. Die Akkumulation von Makrophagen als Antwort auf die Exposition mit Abriebpartikeln und die Phagozytose der Abriebpartikel führt schließlich zu einem Verlust an Knochensubstanz.

Verschiedene „in vivo“ und „in vitro“ Studien haben mit tierischen Monozyten und Makrophagen nach der Phagozytose von Abriebpartikeln bereits gezeigt, dass diese verschiedene Mediatoren produzierten, die schließlich eine erhöhte Aktivität knochenabbauender Zellen zur Folge hatten [Haynes et. al. 1993, 1997, 1998, 2000; Rogers et. al. 1997, Jiranek et. al. 1982].

Hierzu wurde in einer humanen Knochenmarkszellkultur über einen Zeitraum von zwei Wochen die Expression der Zytokine IL – 1 β , IL –6 und TNF – α bei verschiedenen Partikelkonzentrationen beobachtet. Von diesen Größen ist bereits bekannt, dass sie Einfluß auf den Knochenstoffwechsel haben [Canalis 1987, Vaes 1988, Zheng et. al 1992].

Als Indikator für eine zytotoxische Zellschädigung durch die Partikel wurde die Aktivität von LDH bestimmt.

Zusätzlich zu der Beobachtung der Zytokinexpression wurden mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen (FACS – Analysen) Veränderungen der Zellpopulation innerhalb der Knochenmarkszellkultur untersucht, um Hinweise geben zu können auf Veränderungen, die beim Prozess der aseptischen Prothesenlockerung eine Rolle spielen könnten. Dazu wurden die unterschiedlichen Anteile an Granulozyten, B – Lymphozyten, T – Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen und Stammzellen in den Kulturen anhand spezifischer CD – Oberflächenantigene gemessen. Abschließend werden die Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Zellkulturstudien mit humanen Zelllinien verglichen und es soll eine mögliche Interpretation der verschiedenen Ergebnisse erfolgen.

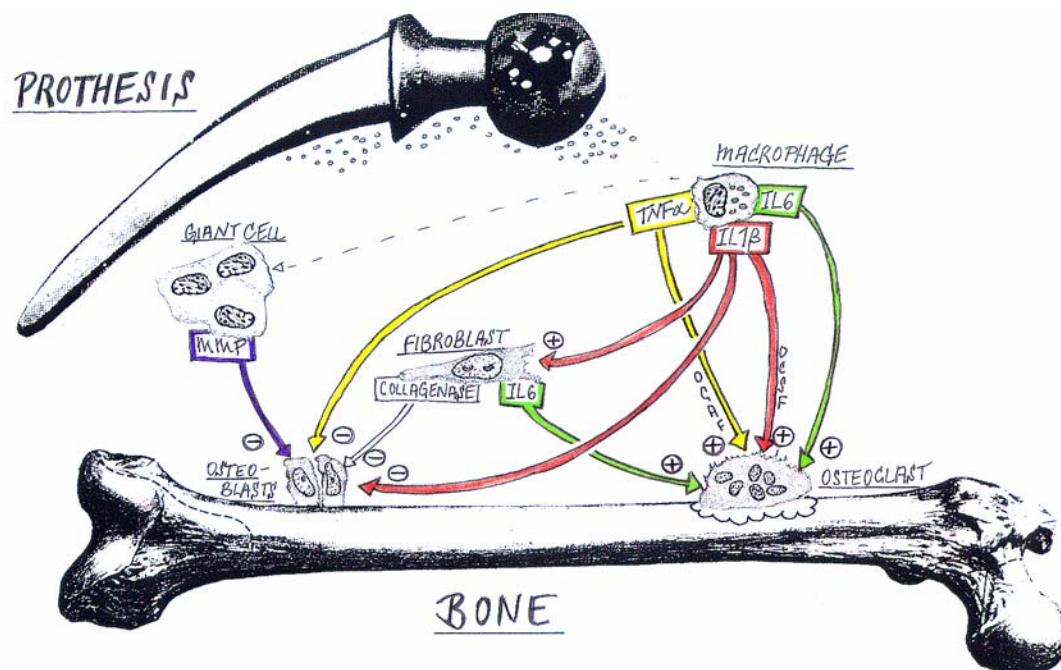


Abb. 22: Beispielhafte Darstellung des Zusammenspiels verschiedener Faktoren im Rahmen der sog. Partikelkrankheit.

2. Material und Methoden

2.1. Knochenmarkspräparation

1991 wurde von Kalla und Mitarbeitern bei der Isolation von humanen Knochenmarkszellen gezeigt, dass erhebliche Unterschiede zwischen dem im Rahmen einer Sternalpunktionsaspiration und dem durch die Operation zur Implantation einer totalen Hüftgelenksendoprothese gewonnenen Spongiosablock bestehen. Obwohl beide Quellen der Zellpopulation – Zusammensetzung von humanem Knochenmark entsprachen, konnte gezeigt werden, dass die absolute Zellzahl die bei der Sternalpunktion gewonnen wurde immer geringer war als die, die aus dem Spongiosablock des Femurschaftes gewonnen werden konnte [Kalla et. al. 1991]

Patienten:

Die Gewinnung markhaltiger Knochenblöcke erfolgte während der Primärimplantation von Totalendoprothesen der Hüfte an 6 Patienten im Alter von 45 bis 70 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 58 Jahren.

Die Ursache für den notwendig geworden Gelenkersatz war in 4 Fällen eine primäre Coxarthrose und in zwei Fällen eine Dysplasiecoxarthrose. Die Patienten litten in keinem Fall an weiteren Vorerkrankungen welche den Knochenstoffwechsel relevant beeinflussen. Alle Patienten hatten vor der Operation eine Eigenblutspende durchgeführt und waren zur Knochenmarkspende vorgesehen. Beide Verfahren gewährleisteten die serologische Testung der Patienten.

Die Entnahme und die Verwendung des Knochenmarks ist durch die Ethikkommission genehmigt [Fragebogen AZ 4/97]

Intraoperativ wurden nach der Femurkopfosteotomie markhaltige Spongiosablöcke von einer Größe von ca. 2,0x2,0x0,1 cm steril aus dem proximalen Femurschaft entnommen.

Die Patienten sind präoperativ über die Materialentnahme aufgeklärt worden.



Abb. 23: Entfernung des Spongiosablockes nach Femurkopfostetomie während einer Hüft-TEP;

Um eine Austrocknung des Knochenmarks sowie eine Blutgerinnung zu verhindern, wurde das intraoperativ gewonnene Stück Spongiosa in einem sterilen Behälter mit liqueminhaltigen Phosphatpuffer (0,2% Liquemin Fa. Hoffmann-La Roche; PBS pH 7,4 Fa. Seromed) aufbewahrt und transportiert.

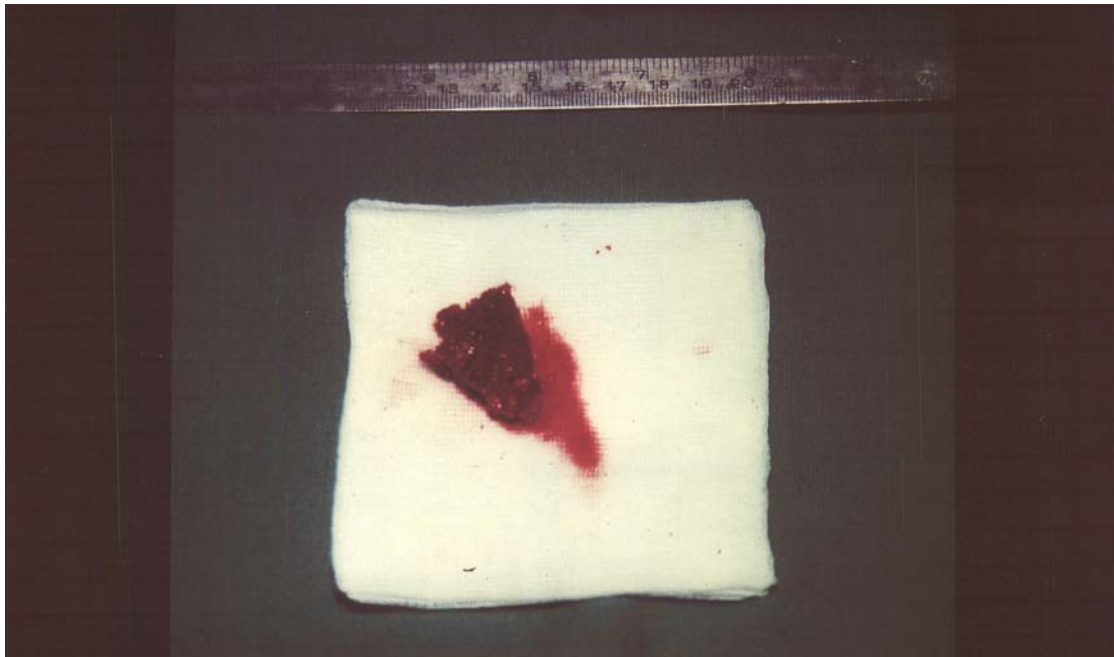


Abb. 24: Spongiosablock nach Entnahme

Anschließend erfolgte die mechanische Zerkleinerung des Spongiosablockes mittels einer Schnabelzange. Das zerkleinerte Material wurde in insgesamt 160 ml Phosphatpuffer – Lösung (PBS) gelöst und dann durch ein Metallsieb mit einer Maschenweite von 0,1 mm geleitet, um die spongiösen Knochenanteile zu separieren. Die gewonnene Zellsuspension wurde auf ein Dichtegradientengemisch (Ficoll, Dichte 1,077, Fa Seromed und Histopaque – 1119 Fa. Sigma Diagnostics Inc, St. Louis, USA im Verhältnis 2:1), geschichtet um dann für 20 min bei 5° C mit 2200 U /min zentrifugiert zu werden.



Abb. 25: Darstellung der Interphase nach dem Zentrifugieren

Nach diesem Vorgang wurde die Interphase entnommen. Es folgten zwei weitere Spülvorgänge mit jeweils 50 ml PBS und dem jeweiligen Zentrifugieren für 10 min bei Raumtemperatur mit 2200 U/min.

Nach Abschluß des letzten Spülvorgangs wurde die Zellsuspension schließlich in ein Kulturmedium aufgenommen.

Die gewonnene Zellzahl wurde mittels eines CASY[®]1 TTC – Zählgerätes bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von ca. 212.000 Zellen / cm² auf 6 – Well – Platten mit einer Fläche von ca. 9,4 cm² pro Well in 2ml Medium ausgesät. Dies ergab eine Zellzahl von 2 Mio Zellen pro Well.

2.2. Beschreibung und Untersuchung des Testmaterials

Die von uns verwendeten Partikel wurden industriell von der Fa. Zimmer Chirurgie GmbH (Warsaw, IN, USA) hergestellt und hatten eine Größe von $\leq 7,5 \mu\text{m}$.

Polyethylenpartikel sind sehr stark hydrophob. Deshalb lösen sich Polyethylenpartikel nicht in Wasser, sondern schwimmen auf der Wasseroberfläche auf.

Die einzige Möglichkeit, die Partikel in flüssiger Lösung zu halten, bestand darin sie in 70 % Ethanol zu lösen. In 70 % Ethanol fielen die Partikel nach einer Weile aus, und sammelten sich am Boden des Gefäßes.

Sämtliche mikroskopischen Betrachtungen haben ergeben, das Polyethylenpartikel sich sehr schnell zusammenlagern und größere Konglomerate bildeten.

Für die Morphologie wurden die Partikel auf einem Deckgläschen mit Gold bedampft (ca. 1,3 min bei 40 mA und einer Spannung von 1,2 kV) und unter einem Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

Zur Bestimmung der Anzahl Polyethylenpartikel pro Gewichtseinheit, wurden 10mg UHMW – PE in 1ml 70% igem Ethanol suspendiert.

Diese Suspension wurde dann mit dem Vortexer aufgeschüttelt und je 0,1ml auf die Neubauzählkammer aufgetragen um die Partikel in der Neubauerzählkammer auszuzählen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 6-mal wiederholt. Aus den Auszählungen wurden dann die Mittelwerte errechnet.

Aus den Errechneten Mittelwerten wurden benötigten Mengen an UHMW – PE Pulver für die gewünschten Konzentrationen bestimmt.

Die Auszählung der einzelnen Felder der Neubauerzählkammer ergab folgende Verteilung für die UHMW – PE Partikel:

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| 0,001 mg Polyethylenpulver ergaben | 10^5 Partikel |
| 0,1 mg Polyethylenpulver ergaben | 10^6 Partikel |
| 1 mg Polyethylenpulver ergaben | 10^7 Partikel |

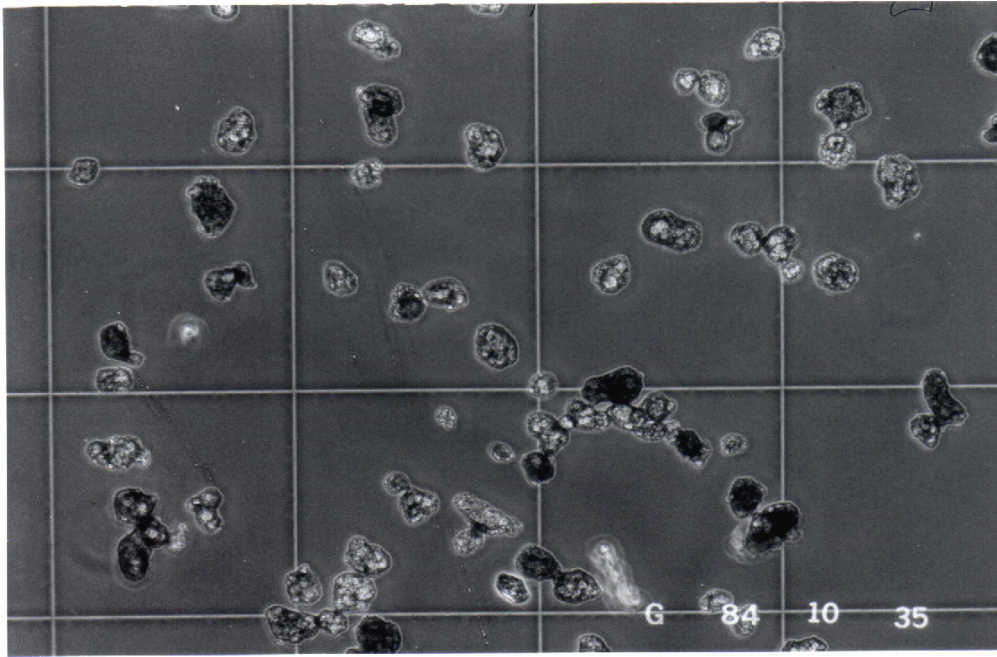


Abb. 26: UHMW – PE Partikel in der Neubauerzählkammer bei 100facher Vergrößerung..

Es ist deutlich zu erkennen, das sich die Partikel aneinander lagern und größere Konglomerate bilden.

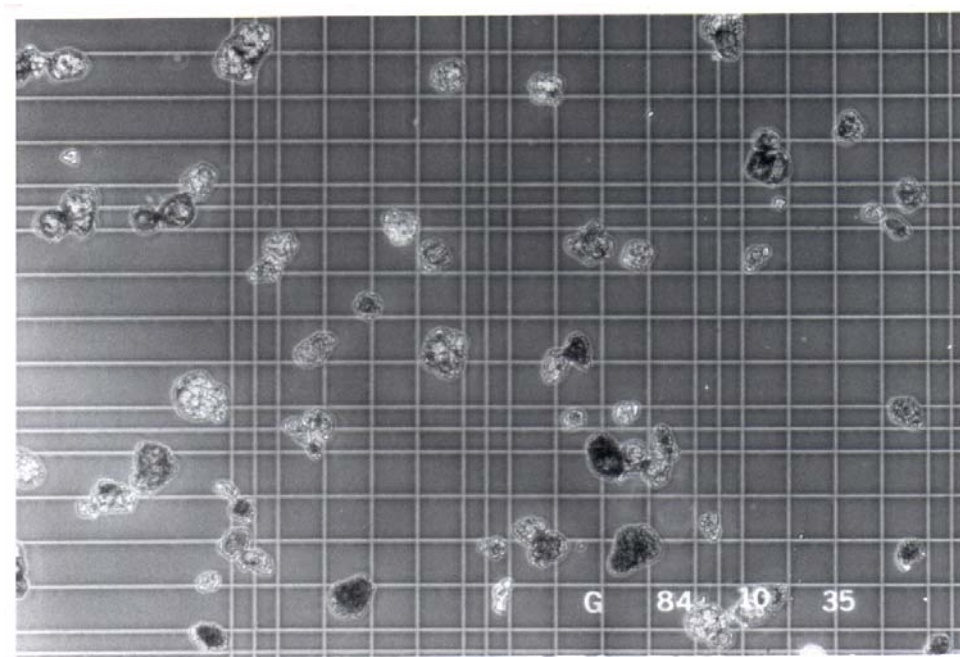


Abb. 27: UHMW – PE Partikel bei 100facher Vergrößerung in lichtmikroskopischer Betrachtung in der Neubauerzählkammer.

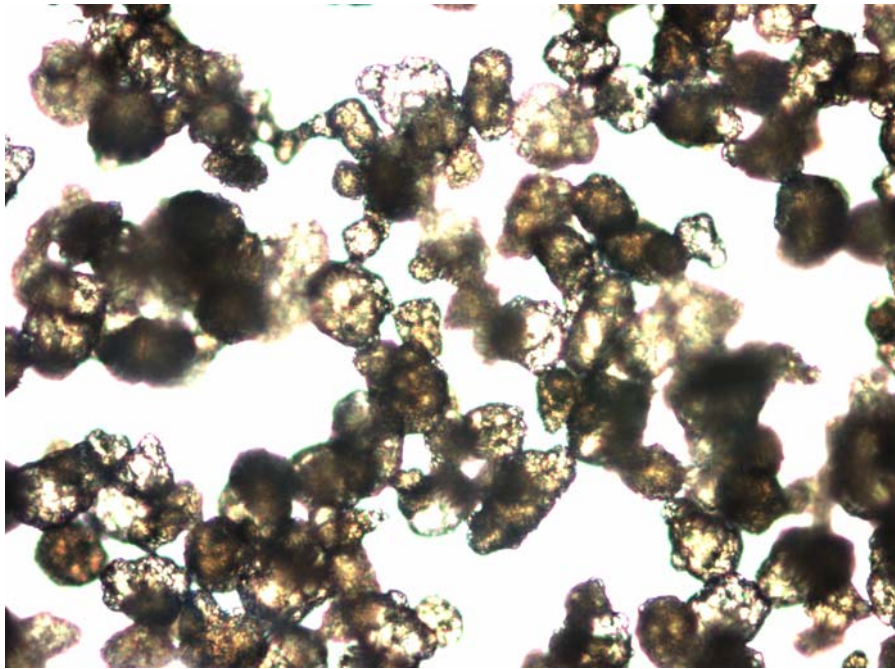


Abb. 28: Lichtmikroskopische Darstellung von UHMW – PE Partikeln in wässriger Lösung bei 100facher Vergrößerung. Die Partikel bilden zusammenhängende Konglomerate.

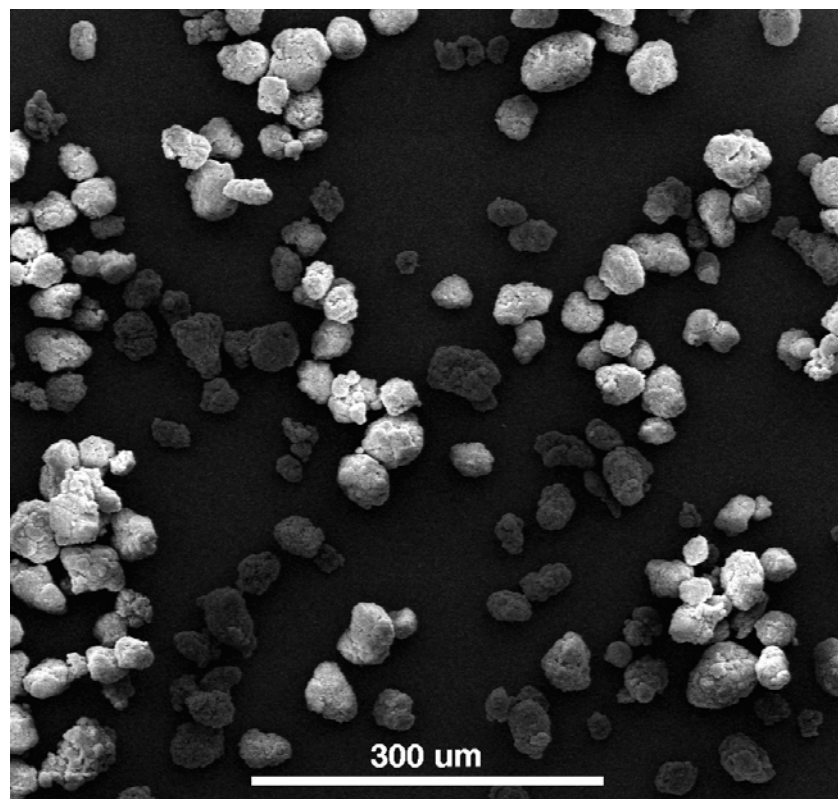


Abb. 29: Rasterelektronische Betrachtung von UHMW – PE Partikeln.

Auch hier ist die Konglomeratbildung deutlich zu erkennen

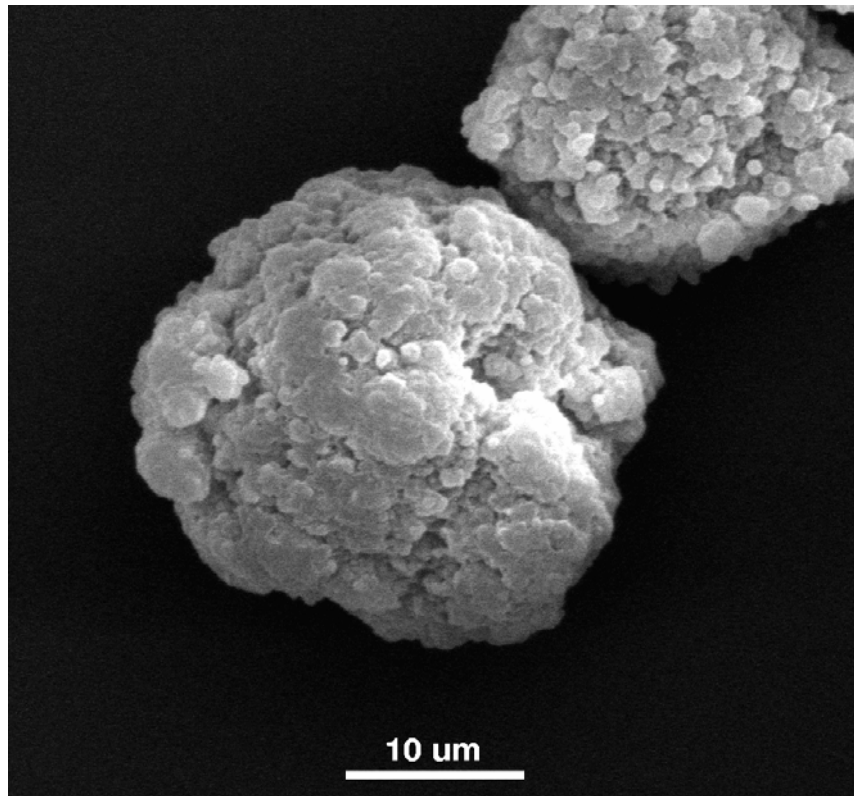


Abb.30: Rasterelektronische Aufnahme eines Konglomerats von UHMW – PE Partikeln. Deutlich zu erkennen sind viele kleine Einzelbrocken mit Größen von durchschnittlich ca. 1 – 3 μm , wie sie von anderen Studien beschrieben worden sind.

Die chemischen Eigenschaften der Polyethylenpartikel, wurden mittels einer Energiedispersiven Röntgenanalyse (SEM / EDX) bestimmt.

Diese Untersuchung zeigte, das neben dem zu erwartenden Nachweis von Kohlenstoff (C) und dem für die Röntgenanalyse verwendeten Gold (Au), welches auf die Partikel aufgedampft wurde, keine weiteren Verunreinigungen im verwendeten UHMW – Polyethylen vorhanden waren, die einen Einfluss auf die humane Knochenmarkszellkultur haben könnten.

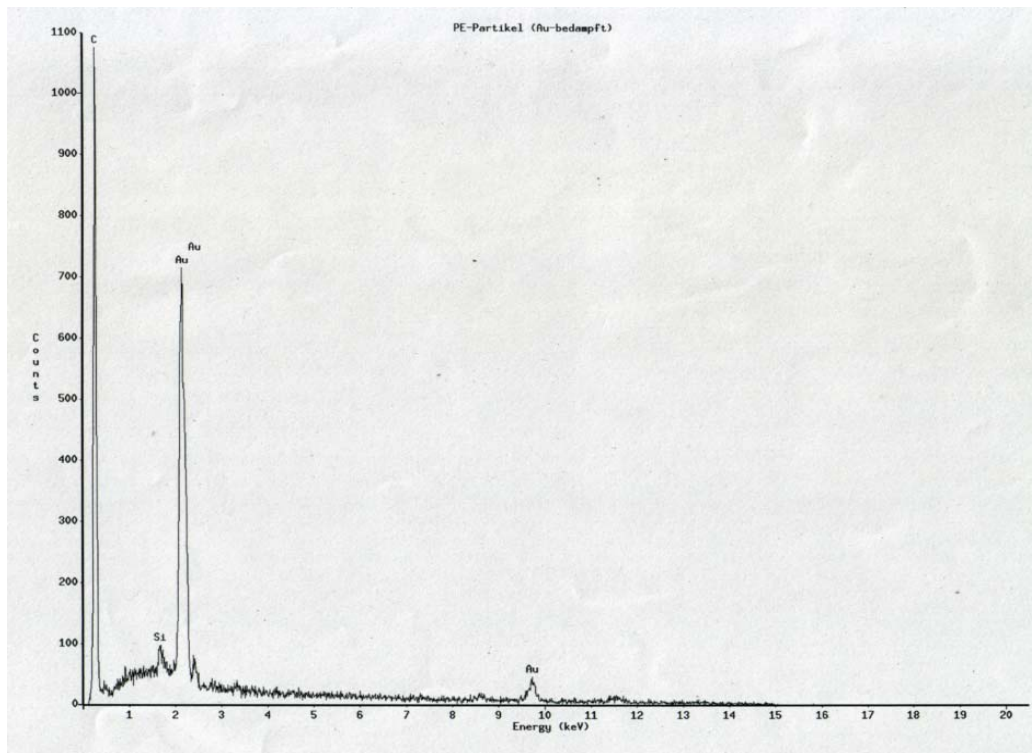


Abb. 31: Energiedispersive Röntgenanalyse der mit Gold bedampften UHMW – PE Partikel.

Neben dem Nachweises von Kohlenstoff ist der Peak für das aufgedampfte Gold (Au) zu erkennen.

2. 2. 1. Kollagen Typ 1

Das von uns als Haftungsträger für unsere UHMW – PE – Partikel verwendete Kollagen Typ 1 der Fa. Becton Dickinson ist als bioinert einzustufen (Produktbeschreibung Rattenschwanz Kollagen, Typ 1, Fa. Becton / Dickinson, Bedford , MA, USA).

2.3. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau gliederte sich in zwei Teile.

Der erste Teil des Versuchsaufbaus diente dazu festzustellen welchen Einfluß das verwendete Kollagen auf die humane Knochenmarkszellkultur hat. Das in dieser Kultur verwendete Typ 1 Kollagen wurde bereits vom Hersteller getestet und als bioinert bezeichnet und freigegeben. Bioinert bezeichnet die Eigenschaft des Kollagens chemisch gesehen keinen meßbaren positiven oder negativen Eigenschaften auf die in dieser Zellkultur untersuchten Zytokine zu besitzen.

Der zweite Teil des Versuchsaufbaus diente dazu mit dem gleichen Zellkulturmodell wie im ersten Teil die Wirkung der UHMW – PE Partikel auf die humane Knochenmarkszellkultur zu untersuchen.

Da der Einfluß des Kollagens auf die Zellkultur bereits im ersten Teil des Versuchsaufbaus überprüft wurde, wurde im zweiten Teil die Zellkultur mit dem Zusatz von Kollagen Typ 1 Lösung ohne den Zusatz von Abriebpartikeln als Kontrolle verwendet. Hierfür wurden entsprechend dem Versuchsprotokoll zwei Millionen Zellen in einer 6 – Well – Platte ausgesät und über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen untersucht.

Da Polyethylen als Werkstoff sehr hydrophob ist, mußten die UHMW – PE Partikel vor der Aussäung der Knochenmarkszellen auf die 6 – Well – Platten auf den Platten befestigt werden.

Zur Fixierung der Partikel wurde eine 0,1 N Kollagen Typ 1 Lösung (Collagen Type 1 Product No. C 8919, Fa. Becton / Dickinson, MA, USA) verwendet.

Die gelieferte Kollagenlösung wurde mit 0,1 M Essigsäure im Verhältniss 1:10 verdünnt, bevor zur Lösung der Polyethylenpartikel verwendet wurde.

Nach dem Abwiegen der Polyethylenpartikel mit einer Analysenwaage wurden die abgewogenen Partikel in den Konzentrationen 1×10^5 , 1×10^6 und 1×10^7 in die Schalen der 6 – Well – Platten gegeben und mit 100 µg der verdünnten Kollagenlösung gelöst. Um eine gleichmäßige Verteilung der Polyethylenpartikel zu erhalten, wurde die Suspension mit 1ml 70 % Ethanol gemischt.

Anschließend wurden die 6 – Well – Platten eine Nacht lang unter UV – Licht getrocknet.

Vor der Verwendung der fertigen Platten wurden sie noch einmal mit sterilem PBS gespült.

Die Zellen wurden dann nach der Vorbereitung in die Vertiefungen der 6 – Well – Platten gegeben und zwei Wochen bei 37° C, 5 % CO₂ und 12,5 % O₂ in Kultur gehalten wobei alle 2 Tage das Medium gewechselt wurde. Das abgesaugte Medium wurde bei - 80° C tiefgefroren. Aus diesen Überständen wurden die Konzentrationen der Zytokine IL – 1 β , IL – 6 und TNF – α mittels Festphasen – Chemiluminiszenz – Enzymimmunoassay (IMMULITE® - Kits, Fa DPC – Biermann, Bad Nauheim) gemessen. Ebenso wurde die Aktivität der LDH photometrisch gemessen.

Die Zelldichte, Verteilung der Partikel und zelluläre Aufnahme von Partikeln während des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen wurden an jedem zweiten Tag im Durchlichtmikroskop (Fa. Olympus) beobachtet.

Zusätzlich wurden einige Kulturen auf 22x22mm großen Deckgläschen ausgesät und nach zwei Wochen rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Einige der Kulturen wurden nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes fixiert, Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch betrachtet und fotografiert.

Am Tag der höchsten Zytokinausschüttung wurde eine FACS – Analyse durchgeführt, um die Entwicklung der Populationen von Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen und Stammzellen zu beurteilen.

Als Nährmedium verwendeten wir Isocoves Modified Dulbecco's Medium mit Zusatz von 12,5 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 12,5 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum, 50 μ mol / l Hydrocortison, 50 mg / l Certomycin, 2 mmol / l L – Glutamin und 0,3 % Natriumbicarbonat [Kalla, Hintz – Obertreis, et al. 1991]

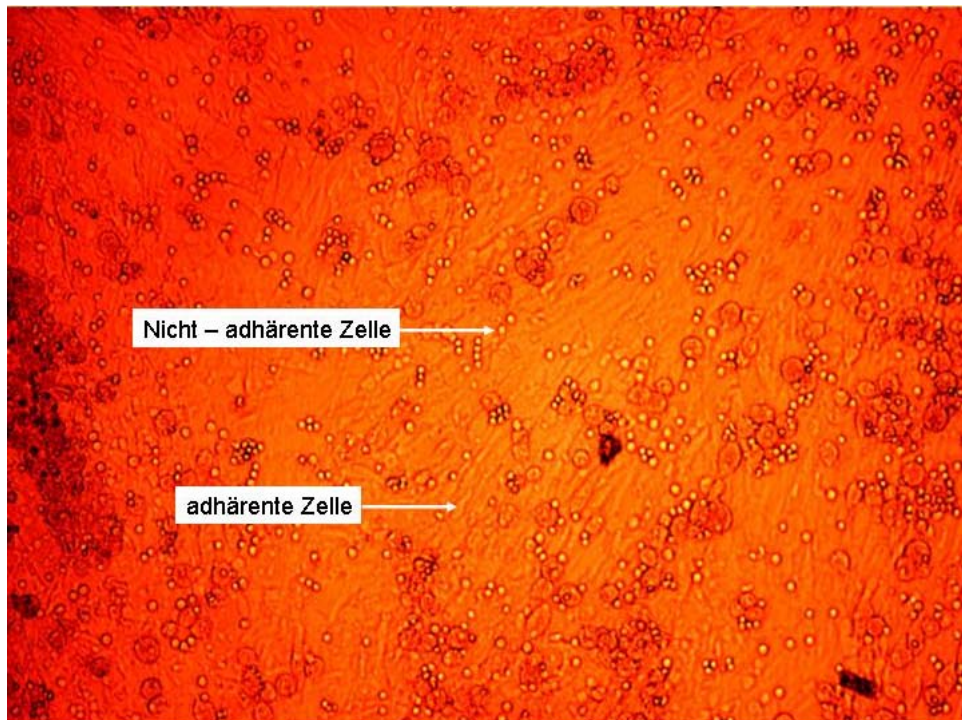


Abb.32: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kontrollkultur ohne Partikel durch das Kulturmedium hindurch, nach 14 Tagen bei 100 facher Vergrößerung. Zu erkennen sind die langgestreckten adhärenenten Zellen und runde, nicht adhärente Zellen.

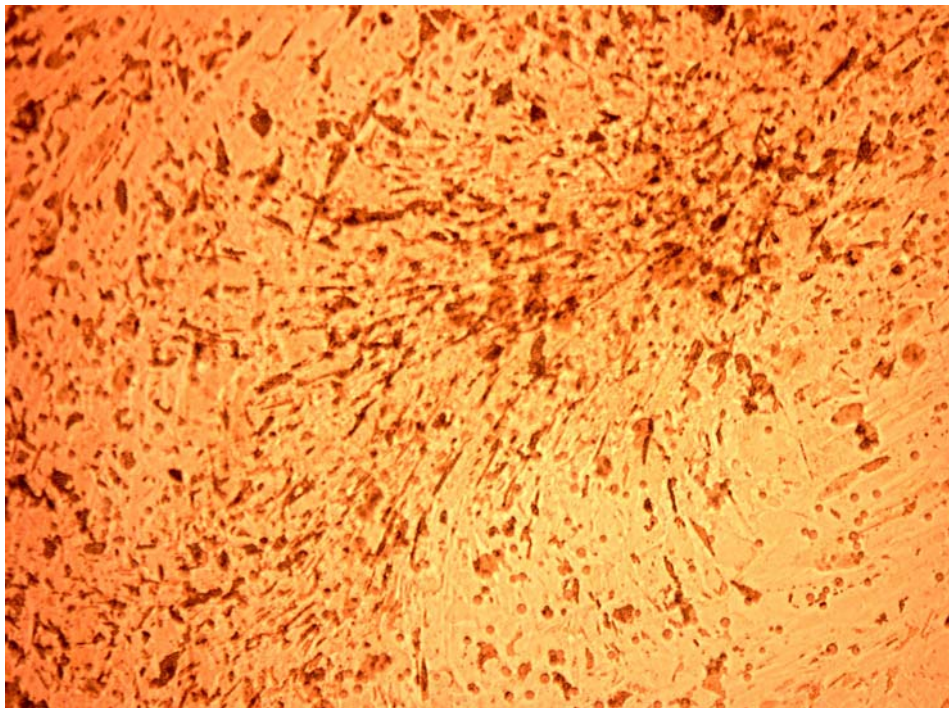


Abb.33: Lichtmikroskopische Betrachtung der Kontrollkultur ohne Partikel bei 100 facher Vergrößerung

2. 4. Zellzahl – Bestimmung mittels CASY® - Zellzähler

Um die Entwicklung der Zellzahlen in den Kulturen beurteilen und über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen beobachten zu können, wurden am Ende der Kulturdauer die verbliebenen Zellen der Kultur im CASY®1 TTC Zellzähler ausgezählt.

Hierzu wurden die Zellen mit 1,5 ml Accutase® vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und in PBS suspendiert. Um möglichst keine Zellen in den Kulturschalen zurückzulassen, wurden die Schälchen noch einmal mit 1ml PBS gespült. Die vollständige Ablösung aller Zellen von den Wells wurde anschließend unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Die Zellsuspension wurde nun auf 20ml PBS aufgefüllt und anschließend für 10min bei Raumtemperatur mit 2200 U / min zentrifugiert, um die Zellen von den Polyethylenpartikeln zu trennen. Die Polyethylenpartikel sammelten sich an der Flüssigkeitsoberfläche, während die Zellen sich als Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens ansammelten.

Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet vorsichtig in 20ml PBS resuspendiert.

Von dieser resuspendierten Lösung wurden nun 10 µl in 10ml der isotonen Analyseflüssigkeit CASYton® gegeben und die verbliebene Zellzahl mit Hilfe des Zellzählers bestimmt

2. 5. Giemsa Färbung

Die Giemsa – Färbung ist einfach und schnell durchzuführen. Sie liefert einen guten Farbkontrast zwischen Zellen und Interzellulärsubstanz der Weich – und Hartgewebe.

In den Präparaten wird mineralisierte Matrix rosa bis zartrosa, Kollagen rosa, Osteoid blassblau sowie Zellen und Zellkerne unterschiedlich blau angefärbt.

Herstellung der Färbelösung:

40 ml käufliche Giemsalösung

160 ml abgekochtes Aqua dest

Die Giemsa – Lösung wird mit dem Aqua dest. verdünnt und ist stets frisch vor der Verwendung anzusetzen.

Färbevorschrift:

30 min Fixierung in 70% Ethanol

4 x 15 min spülen bei Raumtemperatur mit Aqua dest.

45 min färben bei Raumtemperatur mit 10% Giemsalösung

Mehrmals differenzieren in Aqua dest. + 1 – 2 Tropfen Eisessig bis keine Farbwolken mehr entstehen.

Präparate lufttrocknen lassen

Eindecken mit Entellan

2. 6. Messung der Zytokine

In den Überständen der Zellkulturen wurden die Konzentrationen der Zytokine IL - 1 β , IL - 6 und TNF - α mittels Festphasen – Chemiluminiszenz – Enzymimmunoassay (IMMULITE[®] - Kits, Fa DPC – Biermann, Bad Nauheim) gemessen. Dieses Messprinzip funktioniert ähnlich wie herkömmliche ELISA – Methoden und wird zur Routinediagnostik von Zytokinen im klinischen Gebrauch verwendet.

Spezifische, an alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper werden in den Testseren inkubiert und binden kompetitiv oder nach dem Sandwichprinzip an die Antikörper der Festphase. Nach einem Waschvorgang wird ein luminogenes Substrat der alkalischen Phosphatase hinzugefügt. Das entstehende, instabile Spaltprodukt emittiert bei seinem spontanen Zerfall Photonen, die von einem Photomultiplier detektiert werden. Der Messbereich beträgt für IL - 6 2-1000 pg / ml, für IL - 1 β 5 – 1000 pg / ml und für TNF

- α 4 – 1000 pg / ml. Da die Werte für IL – 6 den Meßbereich zum Teil überschritten haben, wurden die entsprechenden Proben mit einer speziellen Verdünnungslösung für die IL – 6 Bestimmungen (Fa. DPC – Biermann) 1:20 und 1:30 verdünnt.

2. 7. Messung der LDH

Als Parameter des Zelluntergangs in den Kulturen wurde die Aktivität der LDH photometrisch gemessen.

2. 8. Aufbereitung der Zellkulturen für die Rasterelektronenmikroskopie

Einige der verwendeten Zellkulturen wurden auf quadratische Deckgläschen mit einer Größe von 22 x. 22 mm ausgesät. Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen wurden die Zellen, die auf den Deckgläschen gewachsen waren, Rasterelektronenmikroskopisch auf ihre Morphologie untersucht.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Deckgläschen aus den Kulturschalen genommen und in einer 2 % Glutaraldehydlösung (in 0,1 M Kakodylatpuffer, pH 7,4) bei Raumtemperatur über Nacht fixiert.

Nach einem dreimaligen Spülvorgang mit 0,1 molarem Kakodylatpuffer über jeweils 5 Minuten wurden die Präparate in 1% Osmiumtetroxidlösung für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur nachfixiert. Im Anschluß an einen erneuten dreimaligen Spülvorgang erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe (50%, 75%, 90%, 95%, 100%) für jeweils 10 Minuten.

Nach der Trocknung der Proben in der Critical Point Kammer wurden die Proben im Sputter – Coater für 1,3 Minuten bei einer Spannung von 1,2kV und einer Stromstärke von 40mA mit Gold bedampft.

2. 9. FACS – Analyse

Bei der Durchflusszytometrischen Untersuchung mit Hilfe von FACS – Analysegeräten (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter) werden markierte Zellen nach den Kriterien Größe, Granulierung, Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzfarbe analysiert und gegebenenfalls auch getrennt sortiert.

Hierzu werden die Zellbestandteile – in diesem Fall CD – Oberflächenantigene – mit an Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Antikörpern markiert.

In der Messkammer werden die Zellen durch einen Argon – Laserstrahl mit einer spezifischen Wellenlänge (488nm) erfasst, das gestreute Licht von verschiedenen Photodetektoren registriert und in elektrische Impulse umgewandelt.

Diese werden dann von einem Computer nach den oben erwähnten Kriterien weiterverarbeitet und graphisch dargestellt.

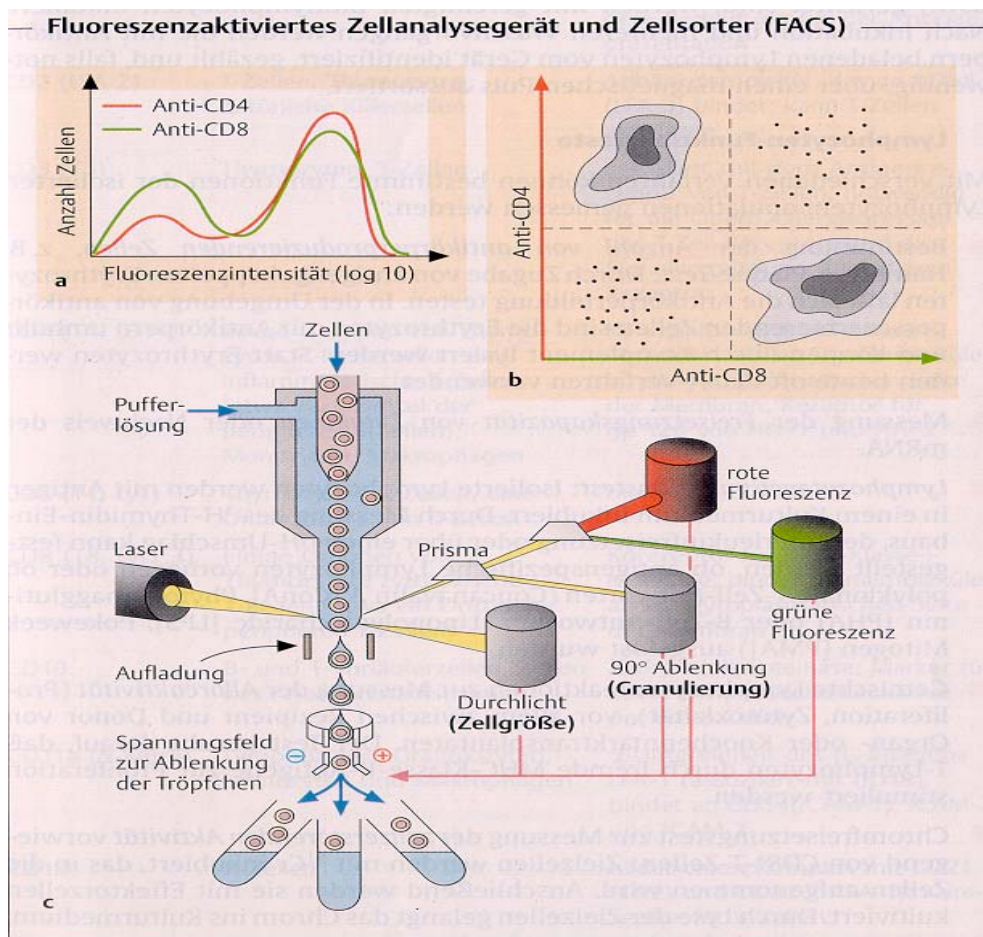


Abb.34: Schemazeichnung einer FACS – Analyse

Für unsere Versuche benutzten wir CD – Antikörper gegen CD – 14, CD – 19, CD – 2, CD – 34, CD – 66b und gegen CD – 3 und CD – 4, die entweder an den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein (FITC) gekoppelt waren.

Phycoerythrin fluoresziert orange bei einem Maximum von ca.580nm, Fluorescein grün bei einem Maximum von 530nm.

Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Computersoftware Graph Pad Prism[®], Version 3.02 als Dot Blot, wobei die Zellen zunächst nach Größe und Granulierung

aufgetragen wurden. In einem weiteren Schritt wurde die gewünschte Population markiert um dann in einem weiteren Blot das Fluoreszenzmuster abzubilden.

Durch die Eingrenzung des gewünschten Bereiches wurde der Prozentuale Anteil der CD – antikörperpositiven Zellen bestimmt.

2. 9. 1. Aufbereitung der Zellen

Nachdem das Medium vorsichtig abgesaugt wurde und die Zellen vorsichtig mit 1ml PBS gewaschen worden waren, wurden die Zellkulturen mit 1,5 ml Accutase® pro Well bei einer Temperatur von 37°C für 10min behandelt. Dadurch lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale.

Die dabei abgelösten Zellen wurden bei einer Temperatur von 5°C und 3000 U / min zentrifugiert, mit 2ml 2%iger TBS/BSA – Lösung (TBS = Triphosphate Buffered Saline, BSA = Bovine Serum Albumine) gewaschen, noch einmal zentrifugiert, um dann anschließend auf Eis gelegt zu werden.

Nach einem erneuten Spülvorgang mit 4ml TBS/BSA wurden die Zellen eines Kulturschälchens auf fünf Rundbodenröhrchen zu je 0,5 ml der Zellsuspension verteilt und erneut zentrifugiert.

Danach erfolgte die Zugabe der CD – Antikörper die mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff (FITC oder PE) gekoppelt waren. Anschließend erfolgte die Inkubation auf Eis für 45 min

Zuletzt wurden die überschüssigen Antikörper mit 2ml TBS/BSA herausgewaschen.

Die Messung erfolgte mit einem FACS – Gerät des Zentrallabors des Klinikums der Universität Marburg

2. 9. 2. CD – 2

Hier wurde ein handelsüblicher PE – konjugierter CD – 2 Leu – 5b Antikörper der Fa. Becton – Dickinson verwendet. CD – 2 wird beim Menschen überwiegend von der Mehrheit der Non – B- Lymphozyten exprimiert. Es ist ein Glykoprotein von 50kDa und ist bereits sehr früh in der T – Zellenentwicklung nachweisbar. Auf ruhenden, reifen T- Lymphozyten befinden sich in etwa 30.000 Moleküle, auf aktivierten T – Lymphozyten befinden sich in etwa 20.000 Moleküle [Meurer, S.C 1998]

2. 9. 3. CD – 3

Hier wurde ein handelsüblicher PE – konjugierter CD – 3 Antikörper der Fa. Becton – Dickinson verwendet. CD 3 ist ein aus 5 Ketten bestehender Proteinkomplex, bei dem die einzelnen Ketten ein Molekulargewicht von 20 – 28 kD aufweisen. CD – 3 ist auf T – Zellen zu finden. Die Funktion von CD – 3 liegt in der Signalübermittlung nach Antigenerkennung durch T – Zellen.

2. 9. 4. 3CD – 4

Hier wurde ein handelsüblicher FITC – konjugierter CD – 4 Antikörper der Fa. Becton – Dickinson verwendet. CD – 4 ist ein Adhäsionsmolekül, welches auf Klasse II MHC – restringierten T – Zellen vorkommt und dort der Signalübermittlung dient. CD – 4 hat ein Molekulargewicht von 55 kD.

2. 9. 5. CD – 14

Hier wurde ein handelsüblicher FITC – konjugierter CD – 14 Leu – M3 Antikörper der Fa. Becton – Dickinson verwendet. CD – 14 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55kDa. Außer im Plasma kommt es auf Monozyten und Makrophagen vor und es ermöglicht deren Bindung an gramnegative und grampositive Bakterien.

2. 9. 6. CD – 19

Hier wurde ein handelsüblicher FITC – konjugierter CD – 19 Leu – 12 Antikörper der Fa. Becton – Dickinson verwendet. Das Membranprotein CD – 19 weist ein Molekulargewicht von 95 kDa auf und gehört zusammen mit CD – 21, CD – 81 und Leu – 13 zu einem Komplex von Komplementbindenden Proteinen auf B – Lymphozyten.

2. 9. 7. CD – 34

Hier wurde ein handelsüblicher PE – konjugierter CD – 34 AntiHPCA – 2 Antikörper der Fa. Becton – Dickinson verwendet. CD – 34 ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 105 – 120 kDa. Nachweisen lässt es sich auf den pluripotenten

Stammzellen des Knochenmarks und auf den primitiven Vorläuferzellen der myeloischen und der lymphatischen Zellreihe.

2. 9. 8. CD – 66b

Hier wurde ein handelsüblicher FITC – konjugierter CD – 66b Antikörper der Fa. PharMingen verwendet. Das Adhäsionsmolekül CD – 66b ist hochspezifisch für myeloide Zellen und kommt auf Granulozyten vor. Es hat ein Molekulargewicht von 95 – 100 kDa.

2. 10. Statistik

Die statistische Auswertung der Zytokinmessungen erfolgte mit Hilfe des t – Testes für unverbundene Stichproben nach Student. Mit Hilfe dieses Testes können die Werte von zwei unterschiedlichen großen Stichproben miteinander verglichen werden, vorausgesetzt, die Werte folgen der Normalverteilung.

2. 10. 1. t – Test für unverbundene Stichproben

Die Teststatistik berechnet sich aus der Formel:

$$T = \frac{\bar{Y} - \bar{X}}{S_{\bar{Y} - \bar{X}}}$$

Dabei sind T = Prüfgröße

\bar{X}, \bar{Y} = Mittelwerte der Kontrollgruppe bzw. der Probengruppe

$S_{\bar{Y} - \bar{X}}$ = Standardfehler der Differenz

$S_{\bar{Y} - \bar{X}}$ = berechnet sich aus der „gepoolten Varianz“: $s_p^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2 + \sum (Y_i - \bar{Y})^2}{m + n - 2}$

m = Anzahl der Werte in der Kontrollgruppe ($m = 4$)

n = Anzahl der Werte in der Versuchsgruppe ($n = 6$)

$$S_{\bar{Y} - \bar{X}}^2 = s_p^2 \cdot \frac{m + n}{m \cdot n}$$

Eine Signifikanz gegenüber den Kontrollen besteht, wenn der errechnete Wert T über dem „Kritischen Wert“ t für die entsprechende Anzahl der Freiheitsgrade f liegt. Der kritische Wert wird aus einer Tabelle abgelesen und beträgt $t = 2,306$ für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ und die Anzahl der Freiheitsgrade $f = m + n - 2 = 8$

Rechenbeispiel:

IL – 6 Spiegel in pg / ml bei 10^5 Partikeln im Medium am Tag der höchsten Zytokinausschüttung.

| Kultur | 1.Wechsel |
|--------|-----------|
| 1 | 26770 |
| 2 | 26747 |
| 3 | 26747 |
| 4 | 20633 |
| 5 | 30000 |
| 6 | 23400 |

| | |
|--------------|---------|
| Mittelwert | 25716,2 |
| Standartabw. | 2966,2 |

$$n = 6$$

$$\bar{Y} = 25716,2$$

IL – 6 Spiegel in pg / ml in der Kontrollkultur am Tag der höchsten Zytokinausschüttung.

| Kultur | 1.Wechsel |
|--------|-----------|
| 1 | 362 |
| 2 | 342 |
| 3 | 373 |
| 4 | 295 |

| | |
|--------------|------|
| Mittelwert | 343 |
| Standartabw. | 29,9 |

$$m = 4$$

$$\bar{X} = 343$$

$$S_p^2 = 82680073,93$$

$$S_{\bar{Y}-\bar{X}}^2 = 82680073,93 \cdot \frac{6+4}{6 \cdot 4} = 34450030,8041\bar{6}$$

$$S_{\bar{Y}-\bar{X}} = \sqrt{34450030,8041\bar{6}} = 5869,414860458$$

$$T = \frac{25716,2-343}{5869,414860458} = 4,32295222$$

T ist damit größer als der kritische Wert $t = 2,306$. Damit sind die von uns ermittelten erhöhten IL – 6 Werte, in diesem Fall stellvertretend in der Kultur mit 10^5 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung auf dem 5% Niveau signifikant.

2. 10. 2. *t* – Test für verbundene Stichproben

Für die Auswertung der Ergebnisse unserer FACS – Analyse verwendeten wir den *t* – Test für verbundene Stichproben, da die Kontrollen und die Testkulturen aus den gleichen Zellpräparationen stammten und damit parallel kultiviert wurden.

Zur Errechnung der Teststatistik wird zunächst der Mittelwert der Differenz aus Proben und Kontrollen nach der Formel $\bar{D} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n D_i$ ermittelt.

Die Standardabweichung der Differenz S_d beträgt $S_d = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (D_i - \bar{D})^2}$,

der Standardfehler von \bar{D} ist $SE = \frac{S_d}{\sqrt{n}}$.

Die Teststatistik T ergibt sich aus $T = \frac{\bar{D}}{SE}$.

Bei der Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ wird die Nullhypothese abgelehnt, falls

$$|t| > t_{n-1; 1-\frac{\alpha}{2}}.$$

Das 0,975te Quantil für $n-1$ Freiheitsgrade wurde aus einer Tabelle abgelesen und beträgt für $n=3$ $t = 4,303$

2. 11. Liste der verwendeten Materialien und Geräte:

Zellkultur

| | |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| PBS | Fa. Seromed, Berlin |
| Biocoll Separation Solution, 1,077 | Fa. Seromed, Berlin |
| Histopaque® - 119 | Fa. Sigma Diagnostics St. Louis, USA |
| Albumin Bovine Fraction V, pH 7,0 | Fa. Serva, Heidelberg |
| Fetal Calf Serum | Fa. Boehringer, Mannheim |
| Horse Serum | Fa. PAA, Linz, Österreich |
| Isocoves modified Dulbecco's Medium (IMDM) | Fa. Life – Technologies, Paisley, Scotland |
| Certomycin 200 | Fa. Essex Pharma, München |
| Hydrocortison | Fa. Sigma Diagnostics, Inc, St.Louis; USA |
| NaHCO ₃ | Fa. Merck, Darmstadt |
| L – Glutamin | Fa. PAA, Linz, Österreich |
| IL – 3 | Fa. Behring, Marburg |
| GM – CSF | Fa. Behring, Marburg |
| Accutase | Fa. PAA, Linz, Österreich |
| CD – 2, Leu – 5b Antikörper, PE – konjugiert | Fa. Becton – Dickinson, Lincoln – Park, USA |
| CD – 3, Antikörper, PE – konjugiert | Fa. Becton – Dickinson, Lincoln – Park, USA |
| CD – 4, Antikörper, FITC – konjugiert | Fa. Becton – Dickinson, Lincoln – Park, USA |
| CD – 14, Leu – M3 Antikörper, FITC – konjugiert | Fa. Becton – Dickinson, Lincoln – Park, USA |
| CD – 19, Leu – 12 Antikörper, FITC – konjugiert | Fa. Becton – Dickinson, Lincoln – Park, USA |
| CD – 34, AntiHPCA – 2 Antikörper, PE – konjugiert | Fa. Becton Dickinson, Lincoln – Park, USA |

CD – 66b Antikörper, FITC – konjugiert

Fa. PharMingen,
San DiegoCA, USA

Chemikalien

NaCl

Fa. Merck, Darmstadt

Tris – Base

Fa. Sigma – Aldrich,
Deisenhofen

Tris HCL

Fa. Sigma Diagnostics,
Inc, St.Louis; USA

Cacodylic acid

Fa. Serva, Heidelberg

Glutaraldehydlösung 25%

Fa. Merck, Darmstadt

Osmiumteroxid – Lösung

Fa. Degussa, Frankfurt

Aceton

Fa. Merck, Darmstadt

Giemsa – Lösung

Fa. Merck, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien

5ml Rundbodenröhrchen (Falcon®)

Fa. Labware Becton –
Dickinson, Franklin
Lakes, NY, USA

15ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®)

Fa. Labware Becton –
Dickinson, Franklin
Lakes, NY, USA

50ml Zentrifugenröhrchen

Fa. Greiner,
Frickenhausen

10ml und 25ml Pipetten

Fa. Greiner,
Frickenhausen

Eppendorf Combitips plus 0,5 ml

Fa. Eppendorf, Hamburg

Petrischalen

Fa. Nunc, Roskilde,
Dänemark

6 – Well – Platten

Fa. Greiner,
Frickenhausen

Zellkulturflaschen

Fa. Greiner,
Frickenhausen

Objekt – Deckgläschen 22 x 22 mm

Fa. Marienfeld

Trägersockel Ø 15 mm x 10 mm

Bottletopfilter 0,45 µm, 0,2 µm

Geräte

Zentrifuge J2 – 21 M/E

Tischzentrifuge Hettich Universal

Wärmeschränke

CASY[®] 1 TTC

CASYton[®]

CASYclean[®]

Critical point – Kammer

Sputter coater S 150

Durchlichtmikroskop IMT 2

Varioclav Dampfsterilisator

FACS Scan[®]

Rasterelektronenmikroskop (Leitz ISI) Sx 30

Fa. Agar Scientific,

Stansted Essex, UK

Fa. Labware Becton –

Dickinson, Franklin

Lakes, NY, USA

Fa. Beckmann, UK

Fa. Hettich, Tuttlingen

Fa. Heraeus

Fa. Schärfe Systems

GmbH Reutlingen

Fa. Schärfe Systems

GmbH Reutlingen

Fa. Schärfe Systems

GmbH Reutlingen

Fa. Balzers – Union,

Liechtenstein

Fa. Edwards, West

Sussex, GB

Fa. Olympus, Tokyo,

Japan

Fa. H + P Labortechnik

GmbH, Oberschleißheim

Fa. Labware Becton –

Dickinson, Franklin

Lakes, NY, USA

Fa. Leitz, Wetzlar

2.12. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|------------------------------------------------------|
| Ak | Antikörper |
| BSA | bovine serum albumine |
| Ca | Carcinom |
| CD | cluster of differenciation |
| CFU | Colony Stimulating Unit |
| CSF | Colony Stimulating Factor |
| Da | Dalton |
| EDTA | ethylene diamine tetraacetic acid |
| EDX | energy dispersive x – ray |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| Fa. | Firma |
| FACS | fluorescence activated cell sorter |
| FITC | Fluorscein |
| FKS | fetales Kälberserum |
| FL | Fluoreszenz |
| FSC | forward scatter |
| G – CSF | granulocyte – Colony Stimulating Factor |
| GM – CSF | granulocyte / macrophage – Colony Stimulating Factor |
| HS | Pferdeserum |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IMDM | Isocove's modified Dulbeccos Medium |
| kDa | Kilo Dalton |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M | molar |
| M – CSF | monocyte / macrophage – Colony Stimulating Factor |
| NKZ | Natürliche Killerzelle |
| OSF | Osteoclast Stimulating Factor |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PMMA | Polymehtylmethacrylat |

| | |
|-----------|--------------------------------------------|
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| SEM | scanning electron microscope |
| TBS | triphosphate buffered saline |
| TEP | Totalendoprothese |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| UHMW – PE | ultra – high molecular weight polyethylene |

III. Ergebnisse

3.1. Kontrolle von Zelloberflächenantigenen (Zelldifferenzierung)

Die Kontrollen der humanen Knochenmarkszellkultur bezüglich der Zelldifferenzierung wurde bereits in vorhergehenden Studien mehrfach in unserem Labor durchgeführt.

Als Untersuchungszeitpunkt wurde zum einen der Tag der Knochenmarkspräparation gewählt. Somit war die Zusammensetzung der humanen Knochenmarkszellkultur am Tag 0 bekannt. Zum anderen wurde die humane Knochenmarkszellkultur nach dreiwöchiger Kulturdauer bezüglich ihrer Zusammensetzung untersucht.

Innerhalb der dreiwöchigen Kulturdauer konnten keine signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung der humanen Knochenmarkszellkultur gefunden werden [Wilke et. al. 1993, 1994, 1997]

3.1.1. Einfluß des verwendeten Kollagen Typ 1 auf die Freisetzung von Mediatoren in der Kontrollkultur

Dieser erste Teil des Versuchsaufbaus diente dazu, den Einfluss der Kollagen – Typ 1 Lösung auf die von uns verwendete humane Knochenmarkszellkultur zu überprüfen.

In bisher vorliegenden Experimenten wurde seitens des Herstellers bereits festgestellt, dass Kollagen Typ 1 als biologisch inert zu betrachten ist. [Produktbeschreibung Rattenschwanz Kollagen, Typ 1, Fa. Becton / Dickinson, Bedford , MA, USA]

Bei dem vorliegenden Experiment wurden nur die ersten drei Mediumwechsel beobachtet. Dies ermöglicht eine Konzentration auf das Wesentliche, weil immerhin in dieser Zeit die Ausschüttung der untersuchten Zytokine in den Kulturen mit Partikeln am größten sind. Zudem spart dies Kosten. Die hier ermittelten Werte wurden verglichen mit bereits bekannten Werten für die Ausschüttung der untersuchten Zytokine bei Kontrollkulturen aus früheren Experimenten, die dieselbe humane Knochenmarkszellkultur verwendeten [Wilke et. al. 2001, 2002].

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, die für 3 verschiedene Partikelkonzentrationen, aus jeder Probe von insgesamt 6 Patienten angefertigt wurden.

Die Nachweisgrenze für IL – 1 β liegt bei 5 pg/ml. Da die meisten ermittelten Ergebnisse für IL – 1 β unterhalb dieser Nachweisgrenze lagen, wurden die entsprechenden Werte für statistische Zwecke mit 5 pg/ml festgesetzt.

Für Interleukin – 6 ergaben sich folgende Werte in pg/ml:

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 356 | 1295 | 590 |
| 2 | 406 | 1365 | 456 |
| 3 | 250 | 1385 | 602 |

| | | | |
|------------|-------|--------|-------|
| Mittelwert | 337,3 | 1348,3 | 549,3 |
|------------|-------|--------|-------|

Tab.1: Wertetabelle für die Ausschüttung von IL – 6 unter Verwendung von Kollagen Typ 1 in pg/ml

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 353 | 1699 | 621 |
| 2 | 316 | 1240 | 585 |
| 3 | 201 | 1240 | 422 |

| | | | |
|------------|-------|--------|-------|
| Mittelwert | 290,0 | 1393,0 | 542,7 |
|------------|-------|--------|-------|

Tab.2: Wertetabelle für die Ausschüttung von IL – 6 ohne Verwendung von Kollagen Typ 1 in pg/ml

MW IL - 6

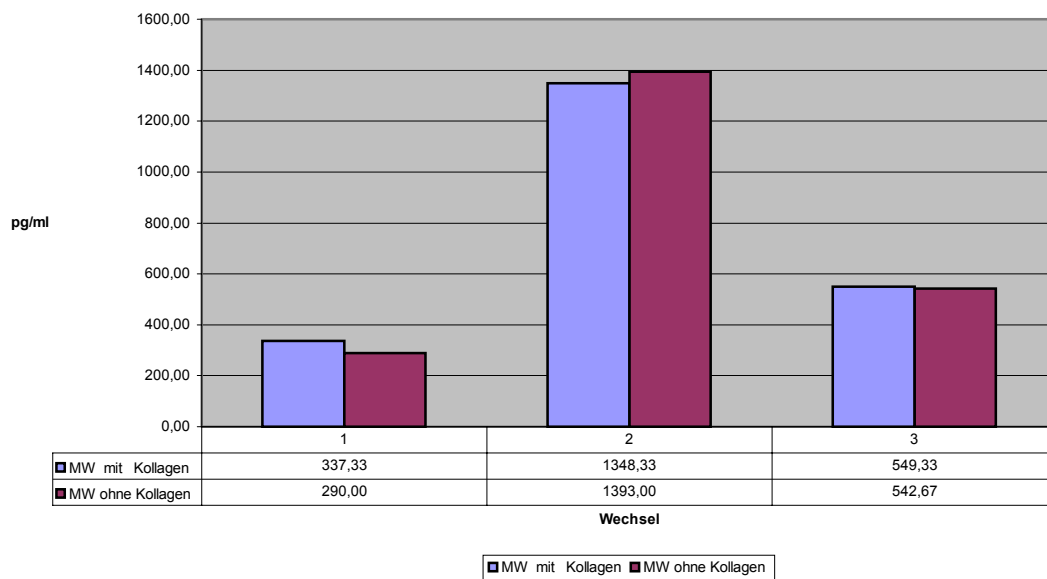


Abb.35: Vergleich der Mittelwerte der Kulturen mit und ohne Kollagen bezogen auf IL – 6 in pg/ml

Für Interleukin - 1 β ergaben sich folgende Werte in pg/ml:

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 5 | 5 | 5 |

| | | | |
|------------|---|---|---|
| Mittelwert | 5 | 5 | 5 |
|------------|---|---|---|

*Tab.3: Wertetabelle für die Ausschüttung von IL - 1 β unter
Verwendung von Kollagen Typ 1 in pg/ml*

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 5 | 5 | 5 |

| | | | |
|------------|---|---|---|
| Mittelwert | 5 | 5 | 5 |
|------------|---|---|---|

*Tab.4: Wertetabelle für die Ausschüttung von IL – 1 β ohne
Verwendung von Kollagen Typ 1 in pg/ml*

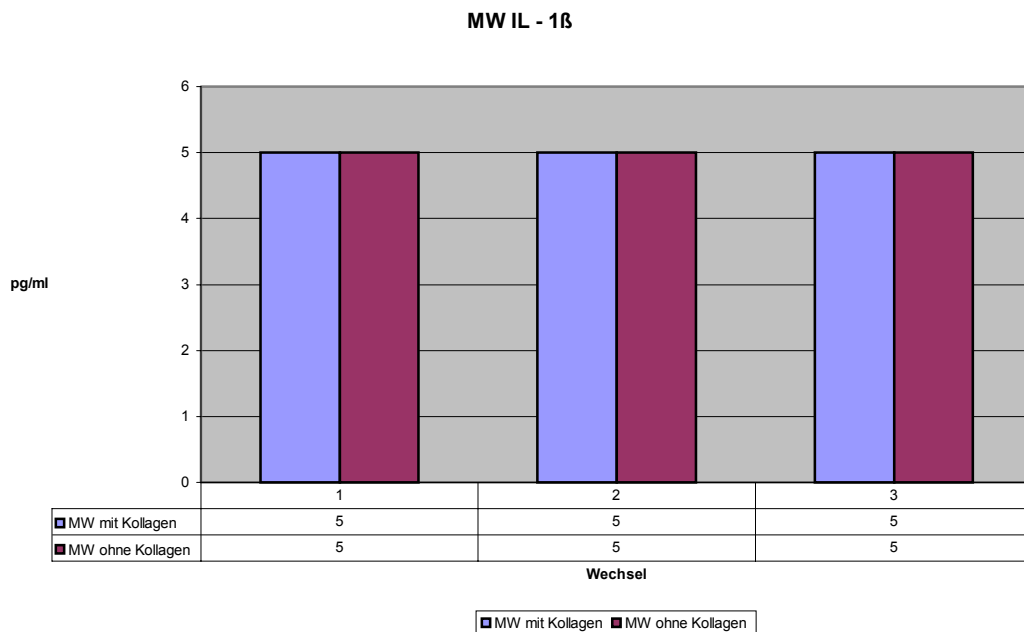


Abb.36: Vergleich der Mittelwerte der Kulturen mit und ohne Kollagen bezogen auf IL – 1 β in pg/ml

Für TNF - α ergaben sich folgende Werte

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 12,5 | 12,6 | 8,4 |
| 2 | 10,6 | 9,2 | 7,5 |
| 3 | 13,2 | 10,2 | 10,3 |

| | | | |
|------------|------|------|-----|
| Mittelwert | 12,1 | 10,7 | 8,7 |
|------------|------|------|-----|

Tab.5: Wertetabelle für die Ausschüttung von TNF – α unter der Verwendung von Kollagen Typ 1

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 10,4 | 10,1 | 9,9 |
| 2 | 11,6 | 9,1 | 8,6 |
| 3 | 10,5 | 10,4 | 9,9 |

| | | | |
|------------|------|-----|-----|
| Mittelwert | 10,8 | 9,9 | 9,5 |
|------------|------|-----|-----|

Tab. 6: Wertetabelle für die Ausschüttung von TNF – α ohne Verwendung von Kollagen Typ 1

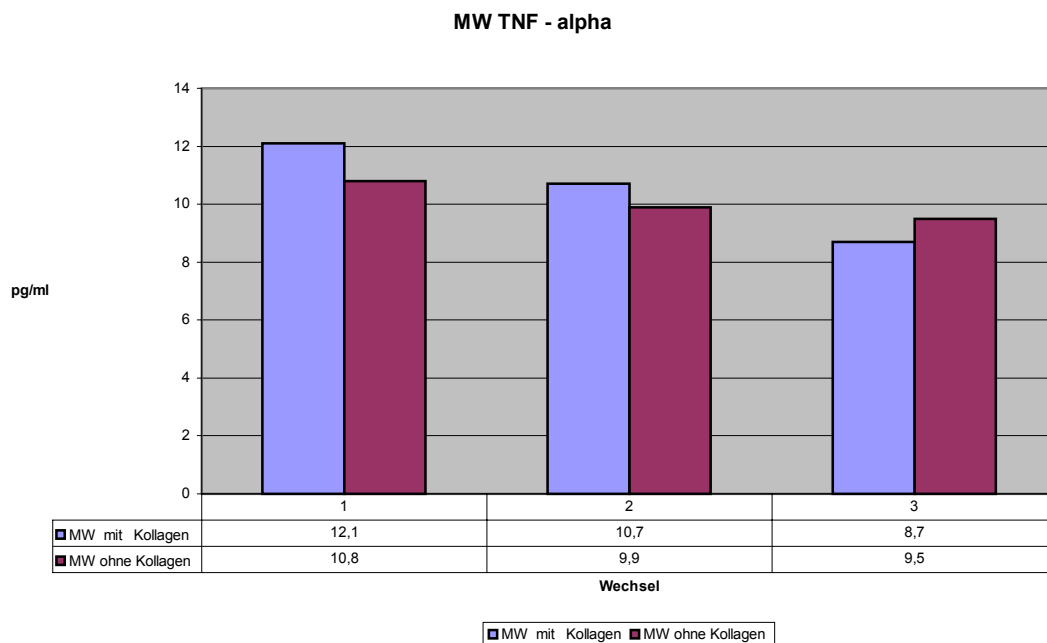


Abb.37: Vergleich der Mittelwerte der Kulturen mit und ohne Kollagen bezogen auf TNF – α in pg/ml

Für LDH ergaben sich folgende Werte in U/l:

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 47 | 38 | 39 |
| 2 | 42 | 35 | 34 |
| 3 | 45 | 33 | 36 |

| | | | |
|------------|------|------|------|
| Mittelwert | 44,7 | 35,3 | 36,3 |
|------------|------|------|------|

Tab. 7: Wertetabelle für die Freisetzung von LDH unter der Verwendung von Kollagen Typ 1 in U/l

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 46 | 36 | 38 |
| 2 | 43 | 35 | 36 |
| 3 | 44 | 37 | 36 |

| | | | |
|------------|------|------|------|
| Mittelwert | 44,3 | 36,0 | 36,7 |
|------------|------|------|------|

Tab. 8 : Wertetabelle für die Ausschüttung von LDH ohne Verwendung von Kollagen Typ 1 in U/l

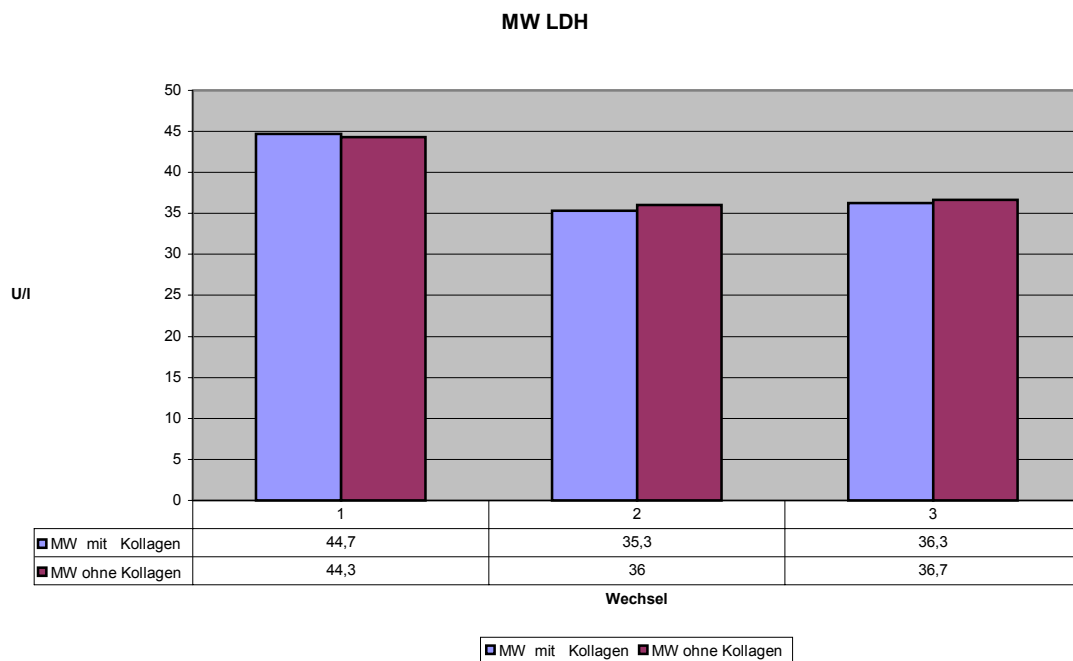


Abb.38: Vergleich der Mittelwerte der Kulturen mit und ohne Kollagen bezogen auf LDH in U/l

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Graphen für diesen ersten Teil des Versuchsaufbaus zeigen, dass die Werte der Kulturen mit dem Zusatz der Kollagen Typ 1 Lösung keinen signifikanten Unterschied zu den Werten der Kulturen ohne den Zusatz von Kollagen Typ1 Lösung aufweisen.

Damit konnte in diesem ersten Teil des Versuchsaufbaus gezeigt werden, dass Kollagen Typ 1 bezogen auf die untersuchten Zytokine keinen messbaren Einfluss auf die von uns verwendete humane Knochenmarkszellkultur hat

3.2. Zellzahlbestimmung über den Kulturzeitraum von zwei Wochen

Frühere Studien über die Kultivierung von humanen Knochenmarkszellen haben konstante Zellzahlen für die von uns in dieser Studie verwendeten Kulturbedingungen ergeben [Wilke 1997, Wilke, Orth, et. al. 1998; Wilke, Landgraff, et. al. 1999].

In dieser Studie haben wir die Zellzahlen der nach Knochenmarkspräparation ausgesäten Zellen in den Kulturen mit Partikeln mit den Zellzahlen der Kontrollkulturen nach zwei Wochen verglichen.

Die Auswertung erfolgte mit einem CASY[®]1 TTC – Zellzähler.

Die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen und Zellresten wurde bereits in einer früheren Studie beschrieben. Das Ergebnis hat gezeigt, dass alle avitalen Zellen und Zellreste einen Durchmesser von kleiner als 6,5 µm hatten [Stürz, S.: Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkszellkultur nach Exposition mit Chrom – Kobalt – Abriebpartikeln. Medizinisches Zentrum für Operative Medizin II der Philipps – Universität Marburg. 2003].

Deswegen wurde als untere Grenze des Messbereiches für vitale Zellen 6,5 µm gewählt. Signale mit einem Durchmesser von über 20 µm stellen Zellaggregate dar.

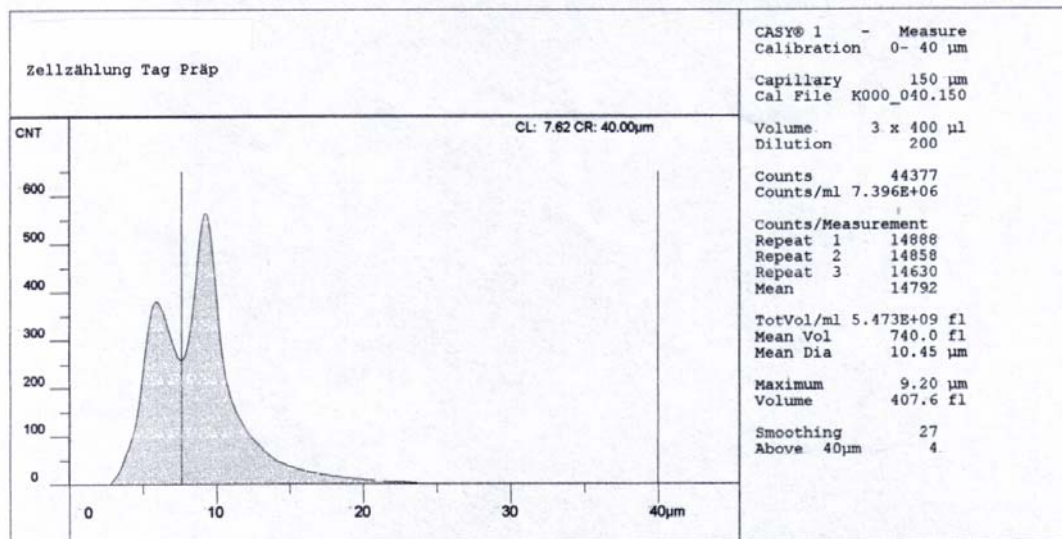


Abb.39: Ermittlung der Zellzahl am Tag der Knochenmarkspräparation. Deutlich zu erkennen ist der Übergang von avitalen Zellen zu den vitalen. Die angegebene Zellzahl bezieht sich auf 1ml. Diese Knochenmarkspräparation ergab eine Gesamtzellzahl von 147 Millionen Zellen in 20 ml IMDM Medium

Bei allen Kulturen wurden die nach zwei Wochen verbliebenen Zellen abgelöst und gewaschen. Mit Hilfe des CASY®1 TTC – Zellzähler wurden die verbliebenen Zellen bestimmt.

Es ergaben sich nach 14 Tagen folgende Werte:

| | |
|---------------------------------------|----------------------|
| Kontrolle | 340.000 Zellen / 2ml |
| 10 ⁵ Partikel / 2ml Medium | 150.000 Zellen / 2ml |
| 10 ⁶ Partikel / 2ml Medium | 148.000 Zellen / 2ml |
| 10 ⁷ Partikel / 2ml Medium | 134.000 Zellen / 2ml |

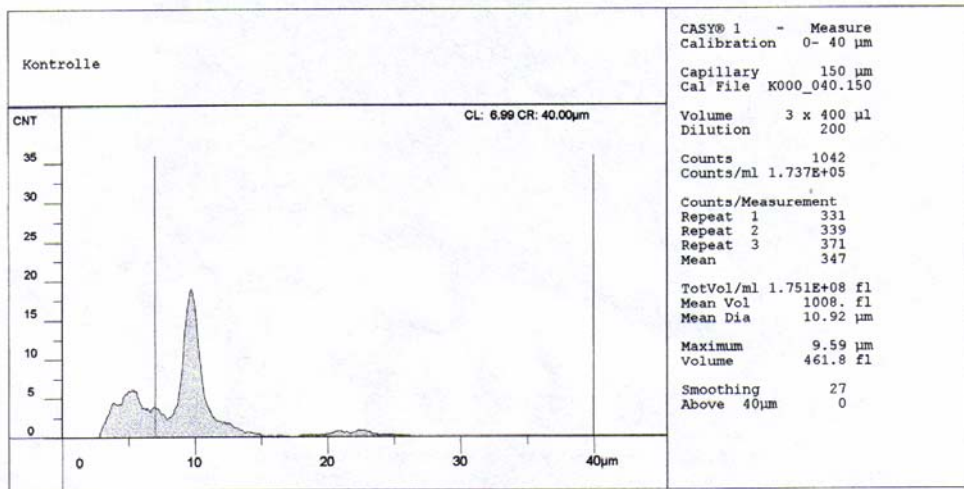


Abb.40: Ermittlung der Zellzahl in der Kontrollkultur. Die Anzahl der gezählten Zellen ist bezogen auf 2ml 340.000. Deutlich zu erkennen ist, dass der Anteil an vitalen Zellen deutlich größer ist als der Anteil avitaler Zellen

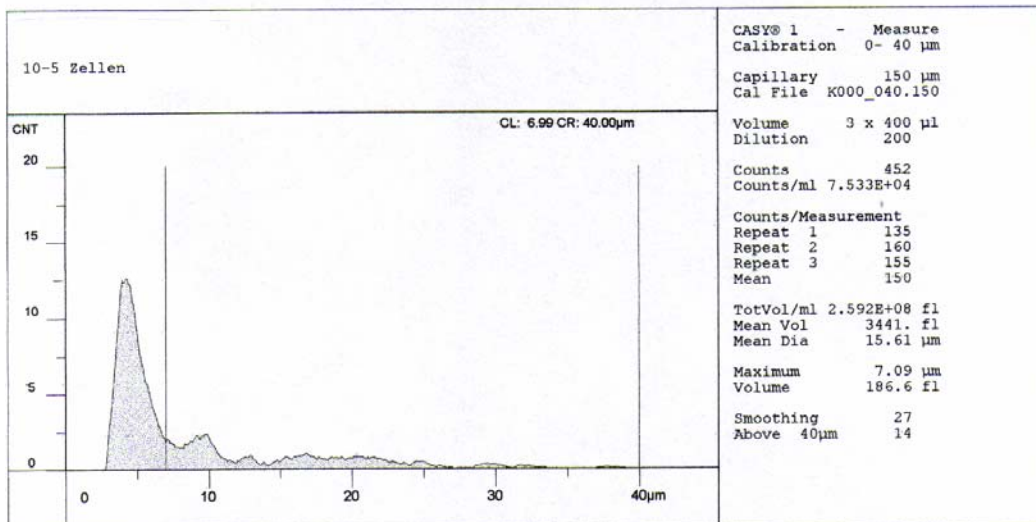


Abb.41: Ermittlung der Zellzahl in der Kultur mit 10^5 Partikel / 2ml Medium. Die gemessene Anzahl an Zellen bezogen auf 2ml ist 150.000. Zu erkennen ist, dass der Anteil an avitalen Zellen größer ist, als der Anteil an vitalen Zellen.

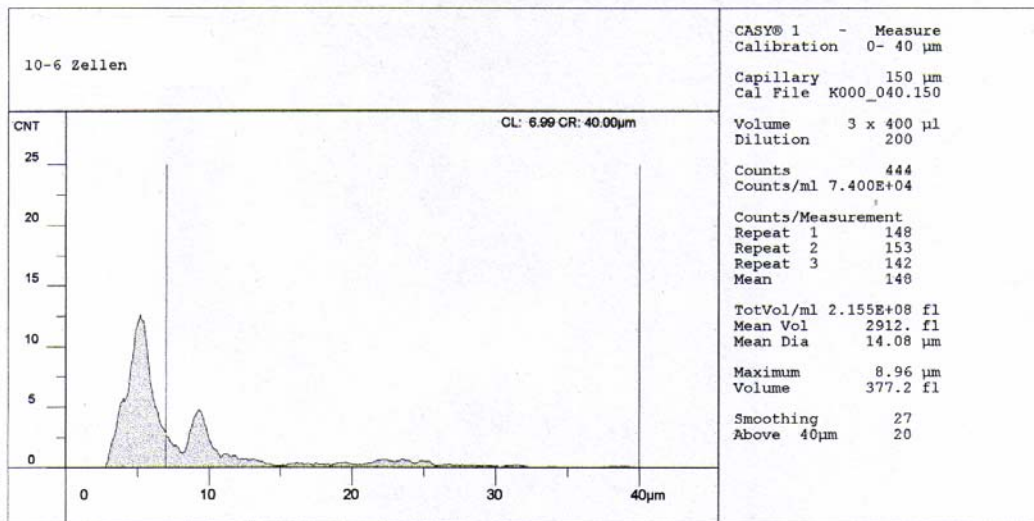


Abb.42: Ermittlung der Zellzahl in der Kultur mit 10^6 Partikel / 2ml Medium. Die Anzahl an gezählten Zellen in 2ml liegt bei 148.000. Der Anteil an avitalen Zellen ist deutlich zu erkennen.

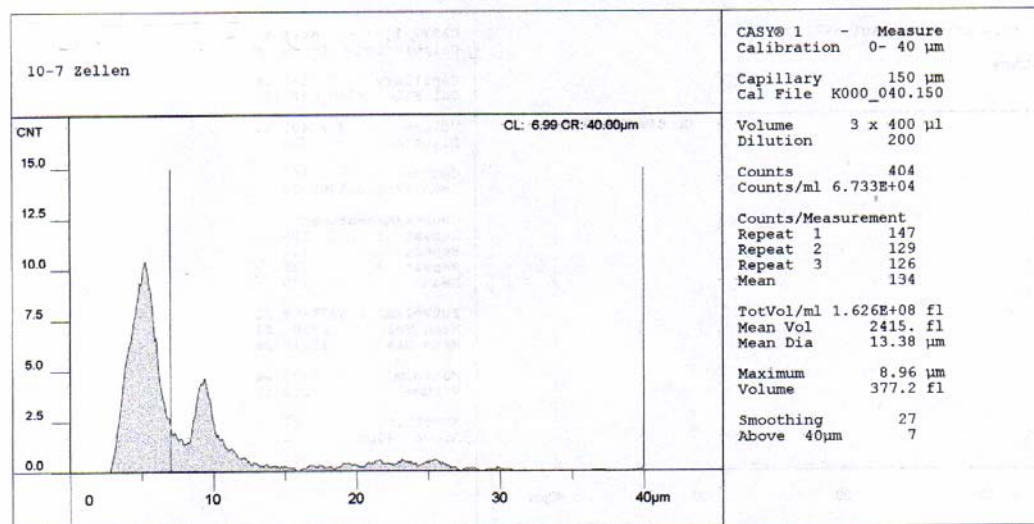


Abb.43: Ermittlung der Zellzahl in der Kultur mit 10^7 Partikel / 2ml Medium. Der Anteil an gezählten Zellen bezogen auf 2ml Medium liegt bei 134.000. Der Anteil an avitalen Zellen ist deutlich zu erkennen.

Die Auswertung der Zellzahlen am Ende des Beobachtungszeitraumes von zwei Wochen hat ergeben, dass in den Kulturen, die den Abriebpartikeln ausgesetzt waren, die Anzahl an gezählten Zellen um ungefähr die Hälfte geringer war als die Anzahl an Zellen die in der Kontrollkultur gezählt werden konnten. Die graphische Auswertung zeigt, dass der Anteil von vitalen Zellen in den Kulturen mit Abriebpartikeln deutlich absinkt. Entsprechend dazu erhöht sich der Anteil an avitalen Zellen in den Kulturen mit Abriebpartikeln.

Insgesamt sind von den ursprünglich 2 Millionen Zellen die pro Well ausgesät wurden in den Kulturen die mit den Abriebpartikeln in Kontakt waren nur noch ca. 1/10 der Zellen als vitale Zellen nachzuweisen.

3. 3. Zytokinprofil der Zellkultur bei Exposition mit UHMW-PE Partikeln

Unter der Exposition mit Polyethylenpartikeln zeigten alle drei Zellkulturreihen während des Inkubationszeitraumes von zwei Wochen kurvenhafte Verläufe der verschiedenen gemessenen Zytokinkonzentrationen. Die hier angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 6 Bestimmungen, die für jeden der 6 Patienten für die jeweilige Partikelkonzentration angefertigt wurden.

3. 3. 1. Interleukin 6 (IL – 6)

Die größten Veränderungen im Zytokinprofil waren bei der Freisetzung von IL – 6 zu beobachten. Durch die Exposition mit Polyethylenpartikeln kam es in den Kulturen zu einem Anstieg auf fast das hundertfache der gemessenen Kontrollwerte.

Es zeigte sich allerdings, dass zwischen den einzelnen Kulturen mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen kein signifikanter Unterschied in den durchschnittlichen Maximalwerten bestand.

Das Maximum des Zytokinanstieges wurde beim 1. Mediumwechsel am 2.Tag nach Aussäung der Zellkulturen gemessen.

Die Proben des 1. und des 2. Mediumwechsels mussten aufgrund der hohen Zytokinkonzentration 1:20 und 1:30 verdünnt werden, da die obere Messgrenze für die untersuchten Zytokine bei 1000 pg/ml liegt.

Die Auswertung ergab als Maximalwerte für die Ausschüttung von IL – 6 im Durchschnitt um die 33.000 pg/ml im Vergleich zu 343 pg/ml in der Kontrollkultur am 2.Tag nach Aussäung der Kultur.

Insgesamt zeigte sich, dass die Werte für IL – 6 nach dem 1. Mediumwechsel bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes wieder deutlich abfielen.

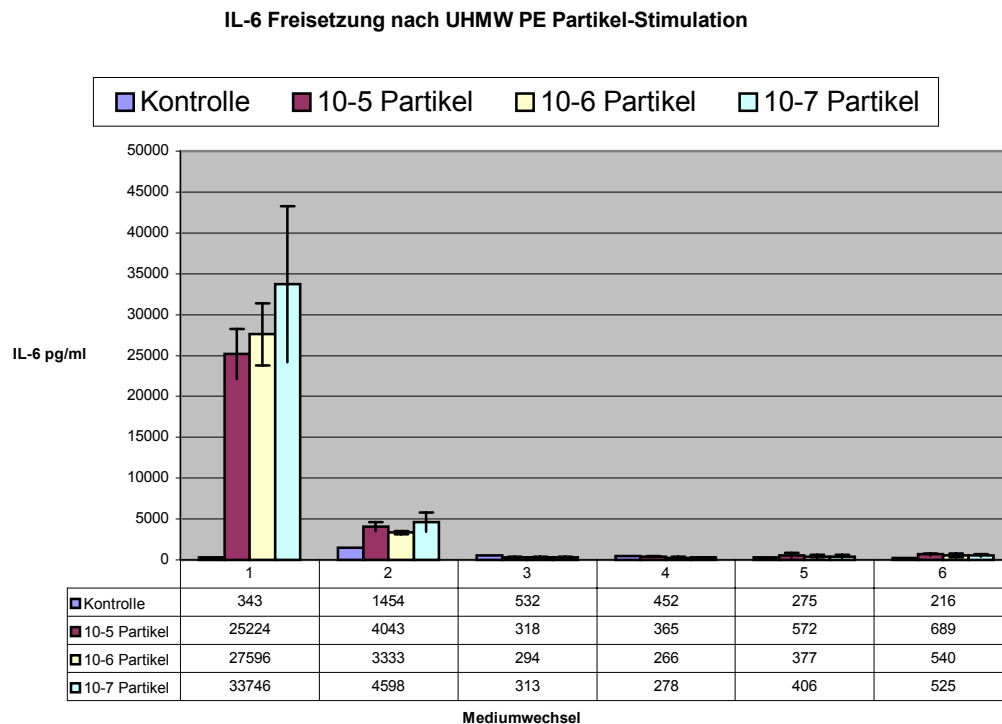


Abb.44: Mittelwerte der IL – 6 Konzentrationen der drei beobachteten Partikelkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Partikel

Die abgebildete Grafik zeigt das Konzentrationsmaximum von IL – 6 beim 1. Mediumwechsel 2 Tage nach Aussäen der Zellkultur. Es zeigt sich, dass die sich die hohe Zytokinkonzentration unabhängig zur Konzentration von Polyethylenpartikeln verhält.

Unten abgebildet sind die Wertetabellen der untersuchten Zellkulturen mit den verschiedenen Partikelkonzentrationen

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) bei 10⁵ Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 26218 | 4671 | 320 | 362 | 424 | 714 |
| 2 | 26441 | 4723 | 384 | 412 | 524 | 612 |
| 3 | 26391 | 4953 | 292 | 404 | 716 | 802 |
| 4 | 20357 | 3962 | 291 | 209 | 221 | 524 |
| 5 | 28580 | 2983 | 342 | 399 | 782 | 759 |
| 6 | 23359 | 2968 | 280 | 405 | 768 | 724 |

| | | | | | | |
|--------------|----------|---------|--------|--------|-------|--------|
| Mittelwert | 25224,33 | 4043,33 | 318,17 | 365,17 | 572,5 | 689,17 |
| Standartabw. | 2907,22 | 891,14 | 39,46 | 78,52 | 223,9 | 102,64 |

Tab. 9: Ergebnisse der Expression von IL – 6 in pg/ml, bei 10⁵ Partikeln im Medium. Die Zytokine wurden zu 6 Zeitpunkten über die Beobachtungsdauer von 2 Wochen bestimmt. Der Abfall der Konzentrationen über den Beobachtungszeitraum ist deutlich zu erkennen.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) bei 10⁶ Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 34272 | 3669 | 346 | 261 | 321 | 534 |
| 2 | 31870 | 3753 | 386 | 246 | 273 | 392 |
| 3 | 30571 | 3769 | 245 | 343 | 413 | 644 |
| 4 | 27589 | 3923 | 249 | 116 | 124 | 322 |
| 5 | 21394 | 2989 | 253 | 259 | 556 | 626 |
| 6 | 19881 | 1896 | 286 | 373 | 576 | 724 |

| | | | | | | |
|--------------|----------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Mittelwert | 27596,17 | 3333,17 | 294,17 | 266,33 | 377,17 | 540,33 |
| Standartabw. | 5825,34 | 775,99 | 58,89 | 89,83 | 173,72 | 155,9 |

Tab. 10: IL – 6 Freisetzung in pg/ml bei einer Partikelkonzentration von 10⁶ Partikeln im Medium. Hier lässt sich ebenfalls der Abfall der Konzentrationen nach dem 1. Mediumwechsel am Tag 2 der Inkubation beobachten.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) bei 10^7 Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 39821 | 5559 | 357 | 305 | 329 | 618 |
| 2 | 38712 | 5759 | 397 | 267 | 305 | 425 |
| 3 | 39708 | 6789 | 278 | 328 | 578 | 632 |
| 4 | 29722 | 2838 | 279 | 152 | 204 | 323 |
| 5 | 28712 | 3825 | 272 | 307 | 410 | 621 |
| 6 | 25803 | 2820 | 296 | 311 | 612 | 533 |

| | | | | | | |
|--------------|----------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Mittelwert | 33746,33 | 4598,33 | 313,17 | 278,33 | 406,33 | 525,33 |
| Standartabw. | 6351,96 | 1669,03 | 51,66 | 65,05 | 160,6 | 126,63 |

Tab. 11: IL – 6 Freisetzung in pg/ml bei einer Partikelkonzentration von 10^7 Partikeln im Medium. Der Abfall der Konzentrationen zeigt sich hier genauso wie bei den niedrigeren Partikelkonzentrationen

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) in den Kontrollkulturen

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 362 | 1453 | 531 | 451 | 274 | 215 |
| 2 | 342 | 1655 | 563 | 395 | 196 | 179 |
| 3 | 373 | 1635 | 421 | 503 | 332 | 286 |
| 4 | 295 | 1073 | 614 | 460 | 298 | 185 |

| | | | | | | |
|--------------|------|-------|-------|-------|-----|-------|
| Mittelwert | 343 | 1454 | 532,3 | 452,3 | 275 | 216,3 |
| Standartabw. | 29,9 | 233,6 | 70,7 | 38,5 | 50 | 42,5 |

Tab.12: IL – 6 Freisetzung in pg/ml in den Kontrollkulturen. Hier zeigt sich ein Anstieg der Zytokinwerte mit dem 2.Mediumwechsel. Nach dem 2.Mediumwechsel ist auch hier ein Abfall der Werte bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes zu erkennen.

Zusammenfassung der Ergebnisse der IL – 6 Messungen

In dieser Versuchsreihe konnten wir statistisch signifikante Anstiege der Konzentrationen von IL – 6 mit allen drei untersuchten Partikelkonzentrationen am Tag des 1. Mediumwechsels nach Aussäung zeigen.

3. 3. 2. Interleukin 1 β (IL – 1 β)

Die Ergebnisse der Interleukin 1 β – Messungen waren insgesamt sehr einheitlich. Die Nachweisgrenze für Interleukin 1 β liegt bei 5 pg/ml. Da sich nur am Anfang des Beobachtungszeitraumes Zytokinkonzentrationen über 5 pg/ml messen ließen, wurden die Werte unterhalb der Nachweisgrenze aus statistischen Gründen mit 5 pg/ml festgelegt.

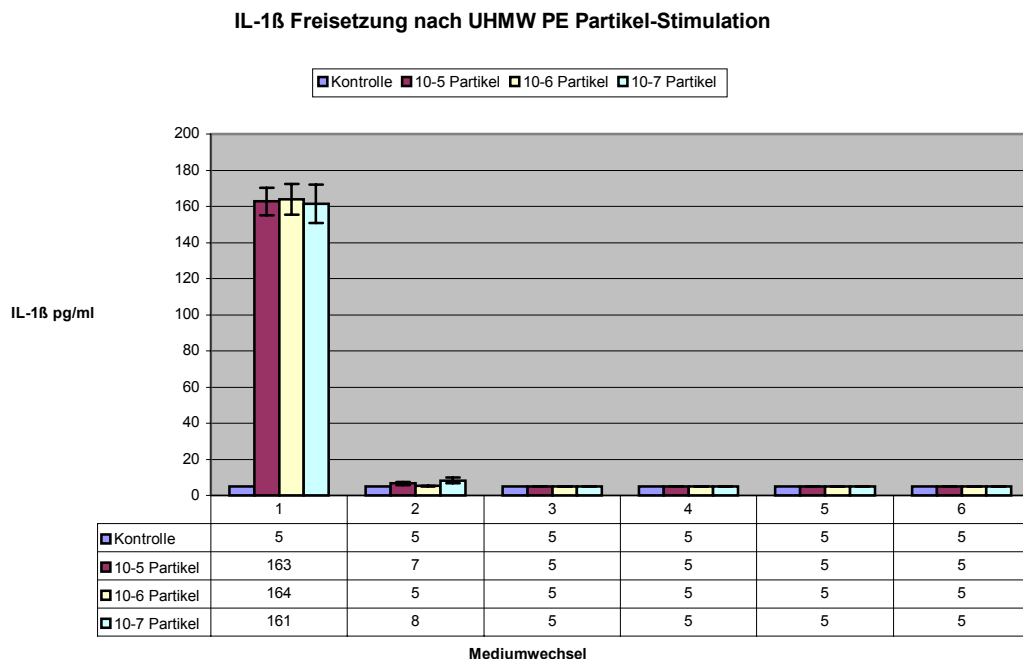


Abb.45: Mittelwerte der IL – 1 β Freisetzung in pg/ml der drei beobachteten Partikelkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollkultur

Unten abgebildet sind die Wertetabellen der untersuchten Zellkulturen mit den drei untersuchten Partikelkonzentrationen.

IL – 1 β Konzentrationen (pg/ml) bei 10⁵ Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 163 | 7 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 170 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 155 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 4 | 165 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5 | 163 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6 | 164 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

| | | | | | | |
|--------------|--------|------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 163,33 | 5,50 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Standartabw. | 4,84 | 0,84 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Tab.13: Die Interleukin 1 – β Expression in pg/ml ließ sich sehr deutlich nur beim 1.Mediumwechsel nachweisen, ab dem 2.Mediumwechsel kommt es zu einem Abfall der Werte unter die Nachweißgrenze von 5 pg/ml Medium

IL – 1 β Konzentrationen (pg/ml) bei 10⁶ Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 155 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 172 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 165 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 4 | 164 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5 | 166 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6 | 163 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

| | | | | | | |
|--------------|--------|------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 164,17 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Standartabw. | 5,49 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Tab.14: Wie bei der oben angegebenen Konzentration ließ sich auch bei einer Konzentration von 10⁶ Partikeln im Medium eine Interleukin 1 – β Expression in pg/ml nur beim 1.Mediumwechsel deutlich nachweisen. Ab dem 2.Mediumwechsel kam es zu einem Abfall der Werte unter die untere Nachweisgrenze.

IL – 1 β Konzentrationen (pg/ml) bei 10⁷ Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 171 | 8 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 150 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 163 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 4 | 161 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5 | 163 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6 | 159 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

| | | | | | | |
|--------------|--------|------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 161,17 | 5,67 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Standartabw. | 6,82 | 1,21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Tab. 15: Ebenso wie bei den anderen untersuchten Partikelkonzentrationen, war auch bei einer Konzentration von 10⁷ Partikeln im Medium eine Interleukin 1 – β Ausschüttung in pg/ml nur beim 1.Mediumwechsel feststellbar. Auch hier kam es ab dem 2.Mediumwechsel zu einem Abfall der Werte unter die untere Nachweisgrenze.

IL – 1 β Konzentrationen (pg/ml) in den Kontrollkulturen

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

| | | | | | | |
|--------------|---|---|---|---|---|---|
| Mittelwert | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Standartabw. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tab. 16: Die Expression von Interleukin 1 – β in pg/ml konnte in der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden, wobei 5 pg / ml Medium die untere Nachweisgrenze zur Bestimmung von Interleukin 1 – β darstellt

Zusammenfassung der Ergebnisse der IL 1 – β Messungen

In allen drei untersuchten Partikelkonzentrationen konnte eine Ausschüttung von IL 1 – β nur beim 1. Mediumwechsel nachgewiesen werden. Ab dem 2. Mediumwechsel bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes ist ein Abfall der Werte unter die Nachweisgrenze von 5 pg / ml Medium festzustellen.

3. 3. 3. Tumornekrosefaktor α (TNF - α)

Die Bestimmung der TNF - α Ausschüttung bei den beobachteten Zellkulturen zeigte einen ähnlich kurventaften Verlauf wie die Werte für IL – 6. Die maximale Zytokinausschüttung fand sich beim 1. Mediumwechsel mit Werten, die die Kontrollwerte bis zu eintausendfach überstiegen. Es zeigte sich ebenfalls wie bei der Bestimmung der IL – 6 Werte, dass die Zytokinausschüttung sich unabhängig zur verwendeten Partikelkonzentration verhielt. Die obere Nachweisgrenze für TNF – α liegt bei 1000 pg/ml. Da für die erste Messung das gesamte vorhandene Substrat aufgebraucht wurde, war es nicht möglich diejenigen Proben zu verdünnen und erneut zu messen, deren Werte über der oberen Nachweisgrenze von 1000 pg/ml lagen. Der erneute Ansatz weiterer Kulturen hätte den Versuchsansatz verfälscht und wurde deshalb nicht durchgeführt. Diejenigen Werte, die oberhalb der Nachweisgrenze lagen sind hier aus statistischen Gründen mit 1000 pg/ml festgelegt.

Im folgenden Diagramm ist die Entwicklung der TNF - α Ausschüttung anhand der Mittelwerte der Kulturen zusammengefasst.

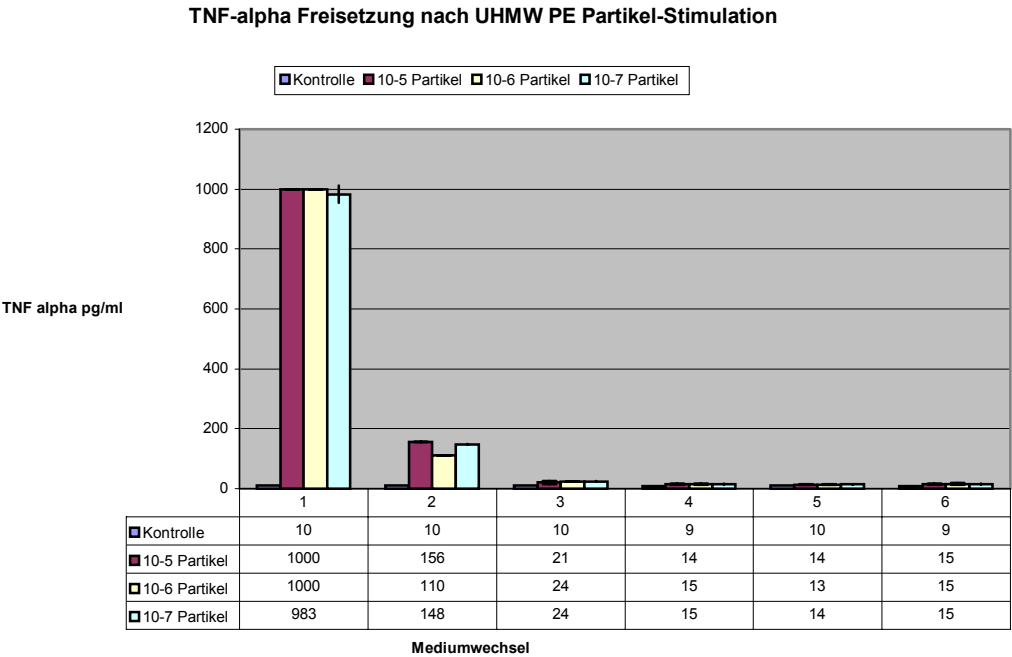


Abb.46: Mittelwerte der TNF - α Konzentrationen in den Zellkulturen mit den drei verwendeten Partikelkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen.

Es folgen die Wertetabellen der TNF - α Konzentrationen für die einzelnen Partikelkonzentrationen

TNF - α Konzentrationen (pg/ml) bei 10^5 Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1000 | 155 | 27 | 17 | 13 | 12 |
| 2 | 1000 | 155 | 18 | 12 | 15 | 17 |
| 3 | 1000 | 157 | 17 | 14 | 13 | 17 |
| 4 | 1000 | 151 | 26 | 19 | 18 | 19 |
| 5 | 1000 | 162 | 16 | 10 | 9 | 11 |
| 6 | 1000 | 158 | 21 | 13 | 14 | 13 |

| | | | | | | |
|--------------|------|-------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 1000 | 156,3 | 20,8 | 14,2 | 13,7 | 14,8 |
| Standartabw. | 0 | 3,3 | 4,3 | 3 | 2,7 | 3 |

Tab. 17: TNF - α Freisetzung in pg/ml bei einer Partikelkonzentration von 10^5 Partikeln im Medium. Die Werte des 1.Mediumwechsel lagen über der oberen Nachweisgrenze von 1000 pg / ml. Nach dem 1.Mediumwechsel ist ein deutlicher Abfall der Werte zu erkennen.

TNF - α Konzentrationen (pg/ml) bei 10^6 Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1000 | 110 | 23 | 17 | 13 | 12 |
| 2 | 1000 | 110 | 24 | 14 | 14 | 17 |
| 3 | 1000 | 111 | 24 | 15 | 14 | 17 |
| 4 | 1000 | 118 | 30 | 22 | 18 | 9 |
| 5 | 1000 | 108 | 20 | 10 | 10 | 20 |
| 6 | 1000 | 104 | 22 | 11 | 11 | 15 |

| | | | | | | |
|--------------|------|-------|------|------|------|-----|
| Mittelwert | 1000 | 110,2 | 23,8 | 14,8 | 13,3 | 15 |
| Standartabw. | 0 | 4,2 | 3,1 | 4 | 2,6 | 3,6 |

Tab. 18: TNF - α Freisetzung in pg/ml bei einer Partikelkonzentration von 10^6 Partikeln im Medium. Beim 1.Mediumwechsel zeigte sich das die Werte über der oberen Nachweisgrenze von 1000 pg / ml lagen. Nach dem 1.Mediumwechsel ist der Abfall der Werte bis Ende des Beobachtungszeitraumes zu erkennen.

TNF - α Konzentrationen (pg/ml) bei 10^7 Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1000 | 148 | 26 | 16 | 15 | 13 |
| 2 | 1000 | 148 | 25 | 16 | 13 | 15 |
| 3 | 1000 | 148 | 23 | 13 | 14 | 17 |
| 4 | 1000 | 168 | 32 | 25 | 21 | 22 |
| 5 | 1000 | 136 | 19 | 9 | 11 | 10 |
| 6 | 899 | 141 | 21 | 11 | 12 | 14 |

| | | | | | | |
|--------------|-------|-------|------|-----|------|------|
| Mittelwert | 983,1 | 148,2 | 24,3 | 15 | 14,3 | 15,2 |
| Standartabw. | 41,2 | 9,9 | 4,1 | 5,1 | 3,2 | 3,7 |

Tab. 19: TNF - α Freisetzung bei einer Partikelkonzentration von 10^7 Partikeln im Medium. Der letzte Wert des 1.Mediumwechsels zeigt, dass sich die Werte nur knapp über der oberen Nachweisgrenze von 1000 pg / ml befanden. Wie bei den beiden anderen verwendeten Partikelkonzentrationen ist auch hier der Abfall der Werte nach dem 1.Mediumwechsel zu erkennen.

TNF - α Konzentrationen (pg/ml) in den Kontrollkulturen

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 10,4 | 10,1 | 9,9 | 10,8 | 9,7 | 8,3 |
| 2 | 11,6 | 9,1 | 8,8 | 8,4 | 8,5 | 8,1 |
| 3 | 10,5 | 10,4 | 9,9 | 7,8 | 10,1 | 9,8 |
| 4 | 10,7 | 11,1 | 9,6 | 7,6 | 10,4 | 8,5 |

| | | | | | | |
|--------------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| Mittelwert | 10,8 | 10,2 | 9,6 | 8,7 | 9,7 | 8,7 |
| Standartabw. | 0,5 | 0,7 | 0,4 | 1,3 | 0,7 | 0,7 |

Tab. 20: Die Untersuchung der Expression von TNF - α in der Kontrollgruppe zeigt konstant niedrige Werte über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen

Zusammenfassung der Ergebnisse der TNF - α Messungen

Die Freisetzung von TNF - α verläuft ähnlich kurvenhaft wie die Freisetzung von IL - 6. Es hat sich gezeigt, dass die Ausschüttung von TNF - α ebenso wie die von IL - 6 sich unabhängig zu den verwendeten Partikelkonzentrationen verhält. Das Maximum der TNF - α Ausschüttung zeigte sich beim 1. Mediumwechsel, wobei die meisten Werte über der oberen Nachweisgrenze von 1000 pg / ml Medium lagen. Der letzte in der Messung der Ausschüttung bei einer Partikelkonzentration von 10^7 Partikeln gefundene Wert zeigt allerdings, dass sich die Werte nur knapp über der oberen Nachweisgrenze liegen.

3. 3. 4. Lactatdehydrogenase (LDH)

Die LDH -Aktivität in den über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen abgenommenen Überständen sollte Aufschluss über die Zytotoxizität der Polyethylenpartikel geben. Erstaunlicherweise fanden sich den untersuchten Kulturen mit allen drei verschiedenen Partikelkonzentrationen nur geringe Erhöhungen der Werte gegenüber den Kontrollwerten.

LDH Aktivität nach UHMW PE Partikel-Stimulation

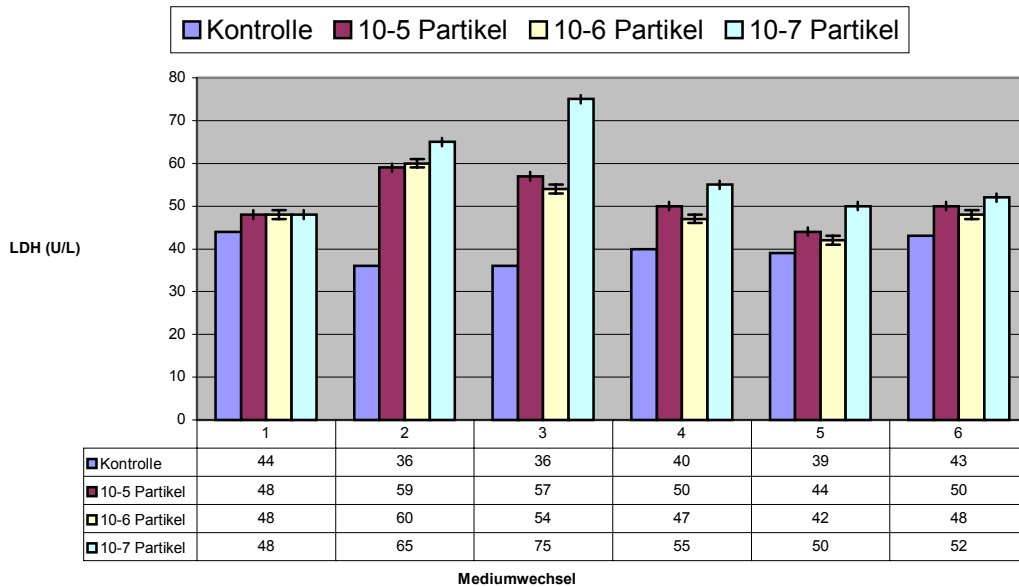


Abb.47: Mittelwerte der LDH –Aktivität in den Kulturen mit den verschiedenen Partikelkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Polyethylenpartikel

Nachfolgend die einzelnen Wertetabellen für die untersuchten Partikelkonzentrationen.

LDH Aktivität (U / l) bei 10^5 Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 48 | 59 | 57 | 50 | 44 | 50 |
| 2 | 47 | 58 | 56 | 51 | 43 | 49 |
| 3 | 49 | 60 | 58 | 49 | 45 | 51 |
| 4 | 50 | 62 | 61 | 44 | 48 | 53 |
| 5 | 46 | 56 | 54 | 52 | 39 | 47 |
| 6 | 47 | 57 | 55 | 56 | 47 | 52 |

| | | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 47,8 | 58,7 | 56,8 | 50,3 | 44,3 | 50,3 |
| Standartabw. | 1,3 | 2 | 2,3 | 3,6 | 2,9 | 2 |

Tab. 21: LDH –Aktivität in U/l bei einer Partikelkonzentration von 10^5 Partikeln im Medium. Die Werte zeigen eine relativ konstante Ausschüttung von LDH während der 6 Mediumwechsel über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen.

LDH Aktivität (U/l) bei 10^6 Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 49 | 60 | 54 | 47 | 42 | 48 |
| 2 | 47 | 61 | 55 | 46 | 41 | 47 |
| 3 | 48 | 59 | 53 | 48 | 43 | 49 |
| 4 | 52 | 65 | 50 | 44 | 51 | 39 |
| 5 | 44 | 57 | 61 | 39 | 38 | 53 |
| 6 | 50 | 59 | 49 | 56 | 36 | 50 |

| | | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 48,3 | 60,2 | 53,7 | 46,7 | 41,8 | 47,7 |
| Standartabw. | 2,5 | 2,5 | 3,9 | 5,1 | 4,7 | 4,3 |

Tab. 22: LDH – Aktivität in U/l bei einer Partikelkonzentration von 10^6 Partikeln im Medium. Auch hier zeigen die Werte eine relativ konstante Ausschüttung von LDH während der 6 Mediumwechsel über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen.

LDH Aktivität (U/l) bei 10^7 Partikeln im Medium

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 49 | 65 | 75 | 55 | 50 | 52 |
| 2 | 47 | 66 | 76 | 54 | 51 | 51 |
| 3 | 48 | 64 | 74 | 56 | 49 | 53 |
| 4 | 56 | 74 | 84 | 62 | 56 | 57 |
| 5 | 45 | 61 | 69 | 49 | 45 | 48 |
| 6 | 44 | 58 | 71 | 56 | 51 | 49 |

| | | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 48,2 | 64,7 | 74,8 | 55,3 | 50,3 | 51,7 |
| Standartabw. | 3,9 | 5 | 4,7 | 3,8 | 3,2 | 2,9 |

Tab. 23: LDH – Aktivität in U/l bei einer Partikelkonzentration von 10^7 Partikeln im Medium. Obwohl die Werte in dieser Konzentration die höchsten sind, besteht kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten.

LDH Aktivität (U / l) in den Kontrollkulturen

| Kultur | 1.Wechsel | 2.Wechsel | 3.Wechsel | 4.Wechsel | 5.Wechsel | 6.Wechsel |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 46 | 36 | 37 | 38 | 41 | 44 |
| 2 | 43 | 35 | 36 | 40 | 38 | 44 |
| 3 | 44 | 37 | 35 | 41 | 39 | 43 |
| 4 | 43 | 37 | 37 | 42 | 39 | 42 |

| | | | | | | |
|--------------|-----|------|------|------|------|------|
| Mittelwert | 44 | 36,3 | 36,3 | 40,3 | 39,3 | 43,3 |
| Standartabw. | 1,2 | 0,8 | 0,8 | 1,5 | 1,1 | 0,8 |

Tab. 24: LDH – Aktivität in U/l in der Kontrollkultur. Die Werte zeigen ein durchgehendes, relativ konstantes Profil.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der LDH

Die Messung der Aktivität von LDH über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen hat gezeigt, dass die untersuchten Kulturen mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen nur geringfügig höhere Werte ergeben haben als in den Kontrollkulturen. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in den LDH Konzentrationen

3. 4. Zelldifferenzierung im Verlauf der zweiwöchigen Kulturdauer mittels FACS Analyse

Die FACS – Analyse erfolgte am Tag der höchsten Zytokinausschüttung. Die in den Tabellen angegebenen Werte sind prozentuale Angaben, die von dem von uns verwendeten FACS – Gerät für die jeweils untersuchten CD – Antikörper angegeben wurden. Diese Werte wurden der Berechnung der Veränderungen in den einzelnen Zellpopulationen zugrunde gelegt. Insgesamt sind pro Messung 10.000 Ereignisse gezählt worden, aus denen die prozentuale Verteilung für die jeweils untersuchten CD – Antikörper ermittelt wurde. Da immer zwei verschiedene CD – Antikörper gegeneinander getestet wurden, sind die graphischen Darstellungen bezogen auf zwei verschiedene CD – Antikörper. In der graphischen Auswertung wurden die Ergebnisse der Kontrollkultur mit den Ergebnissen aus den Kulturen unter Verwendung von Abriebpartikeln verglichen. Zusätzlich wurden auch die Ergebnisse der Kulturen unter Verwendung der Abriebpartikel untereinander verglichen. Die Anzahl der Sterne in der graphischen Darstellung steht für das jeweilige Signifikanzniveau.

Es folgen die Wertetabellen und die Schaubilder der jeweiligen Untersuchung

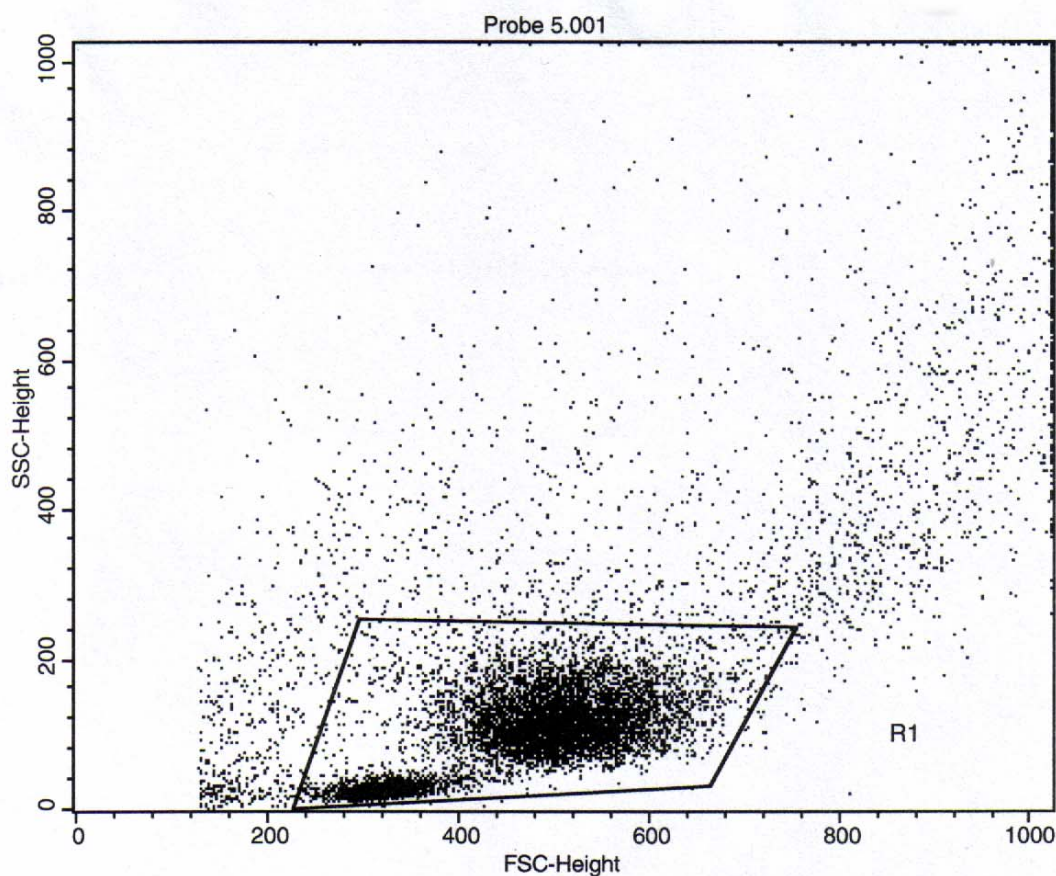


Abb.48: Darstellung der Gesamtverteilung der Zellen und der zur Auswertung gewählte Bereich am Beispiel einer Probe unter der Verwendung von 10^5 UHMW – PE Partikeln pro Zellkultur

3. 4. 1. CD 14

Es folgen die Wertetabellen in Prozent bezogen auf die CD 14 positiven Zellen.

| Patient | Kontrolle | 10⁵ | 10⁶ | 10⁷ |
|----------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| A | 1.400 | 19.450 | 17.570 | 19.270 |
| B | 7.350 | 18.110 | 14.260 | 18.460 |
| C | 7.000 | 18.760 | 19.210 | 18.060 |
| D | 7.240 | 19.400 | 19.530 | 15.750 |

Tab.25: Die Wertetabelle der 4 Patienten in Prozent für CD 14 positive Zellen am Tag der höchsten Zytokinausschüttung.

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 14 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-5} |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0001 |
| P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=8.878 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 5.748 \pm 1.451 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-5} | 18.93 \pm 0.3153 N=4 |
| Difference between means | -13.18 \pm 1.485 |
| 95% confidence interval | 9.549 to 16.82 |
| R squared | 0,9293 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 21.18, 3, 3 |
| P value | 0,0160 |
| P value summary | * |
| Are variances significantly different? | Yes |

Tab. 26: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-5} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 14 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0007 |
| P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=6.304 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 5.748 \pm 1.451 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 17.64 \pm 1.206 N=4 |
| Difference between means | -11.90 \pm 1.887 |
| 95% confidence interval | 7.277 to 16.51 |
| R squared | 0,8688 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.447, 3, 3 |
| P value | 0,3845 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 27: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^6 Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 14 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-7} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0003 |
| P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=7.421 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 5.748 \pm 1.451 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-7} | 17.89 \pm 0.7549 N=4 |
| Difference between means | -12.14 \pm 1.636 |
| 95% confidence interval | 8.135 to 16.14 |
| R squared | 0,9017 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 3.695, 3, 3 |
| P value | 0,1558 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 28: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-7} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 14 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^6 |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,3416 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.033 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 18.93 \pm 0.3153 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 17.64 \pm 1.206 N=4 |
| Difference between means | 1.288 \pm 1.247 |
| 95% confidence interval | -4.339 to 1.764 |
| R squared | 0,1509 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 14.65, 3, 3 |
| P value | 0,0269 |
| P value summary | * |
| Are variances significantly different? | Yes |

Tab. 29: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^6

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 14 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^7 |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,2486 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.277 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 18.93 \pm 0.3153 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 17.89 \pm 0.7549 N=4 |
| Difference between means | 1.045 \pm 0.8180 |
| 95% confidence interval | -3.047 to 0.9567 |
| R squared | 0,2138 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 5.733, 3, 3 |
| P value | 0,0927 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 30: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 14 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^6 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,8703 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.1704 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 17.64 \pm 1.206 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 17.89 \pm 0.7549 N=4 |
| Difference between means | -0.2425 \pm 1.423 |
| 95% confidence interval | -3.240 to 3.725 |
| R squared | 0,004816 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.554, 3, 3 |
| P value | 0,2307 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 31: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^6 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

Graphische Darstellung der Auswertung der FACS Analyse am Tag des 1. Mediumwechsels

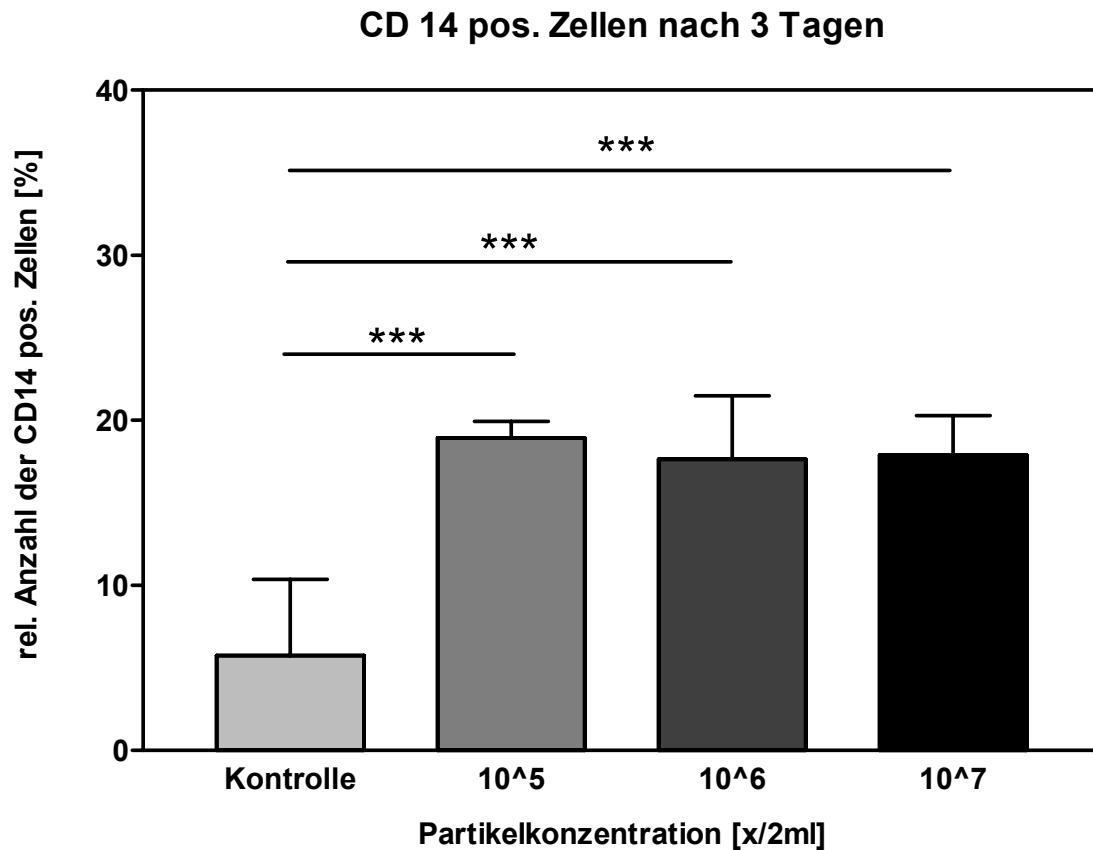


Abb.49: Graphische Darstellung der Entwicklungen der Zellpopulationen in Prozent bezogen auf die einzelnen Kulturen unter Verwendung von UHMW – PE Partikeln in unterschiedlichen Partikelkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Die Anzahl der Sterne zeigt das jeweilige Signifikanzniveau. Es ist zu erkennen, dass die Veränderungen in Richtung der CD 14 positiven Zellen in den Kulturen, die mit Abriebpartikeln versetzt waren 3 – fach signifikant gegenüber den Werten der Kontrollkultur sind

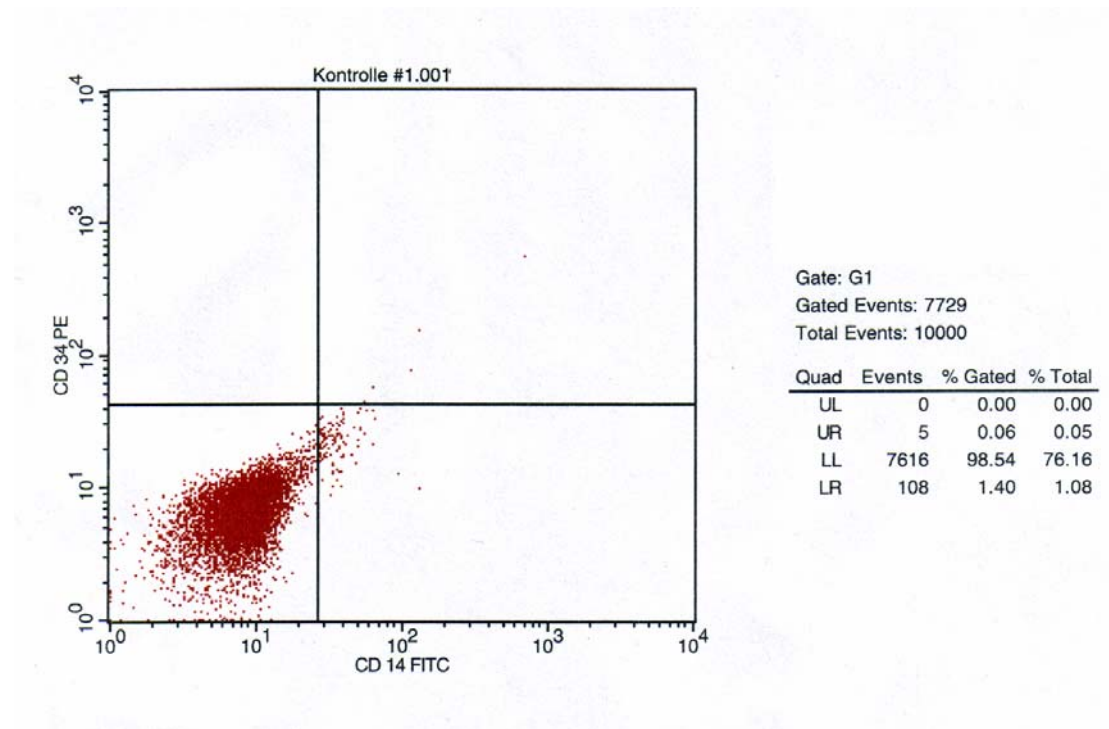


Abb. 50: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 14 positiven Zellen gegen CD 34 positive Zellen in der Kontrollkultur am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

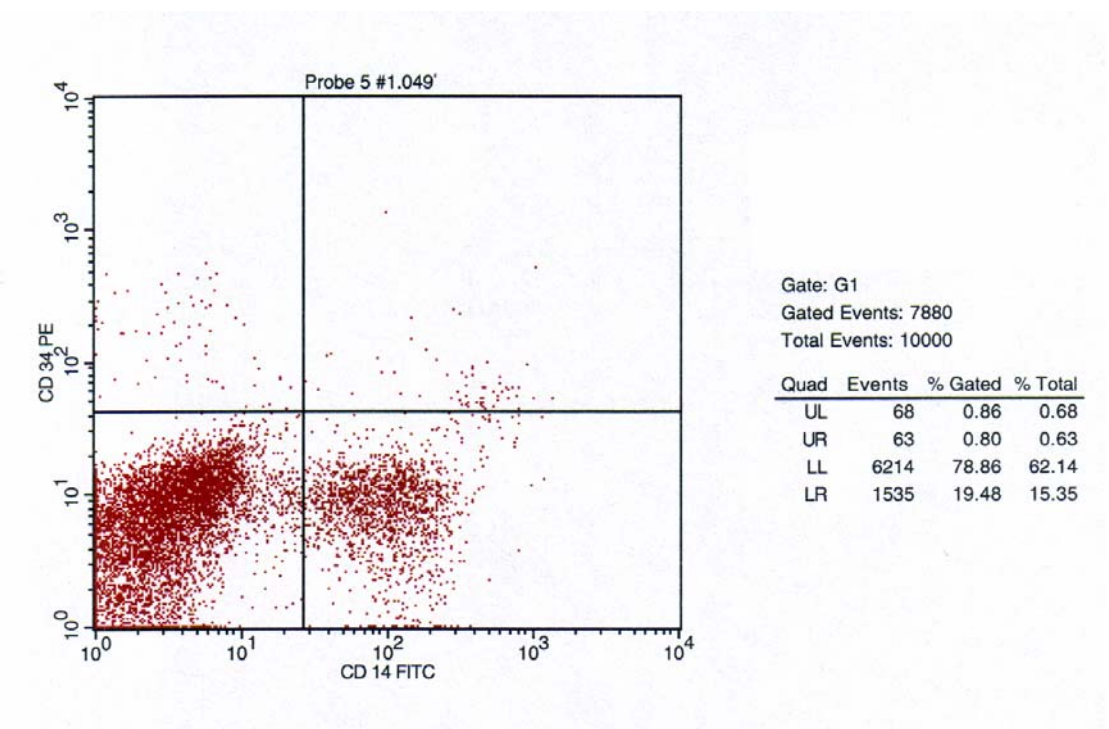


Abb. 51: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 14 positiven Zellen gegen CD 34 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^{-5} Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

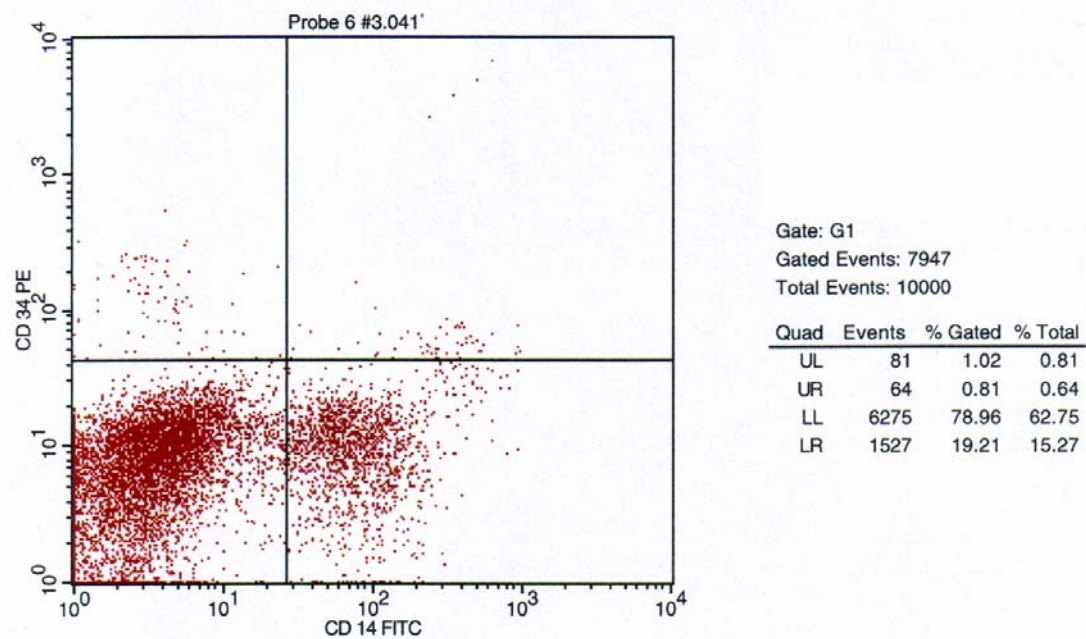


Abb. 52: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 14 positiven Zellen gegen CD 34 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^6 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

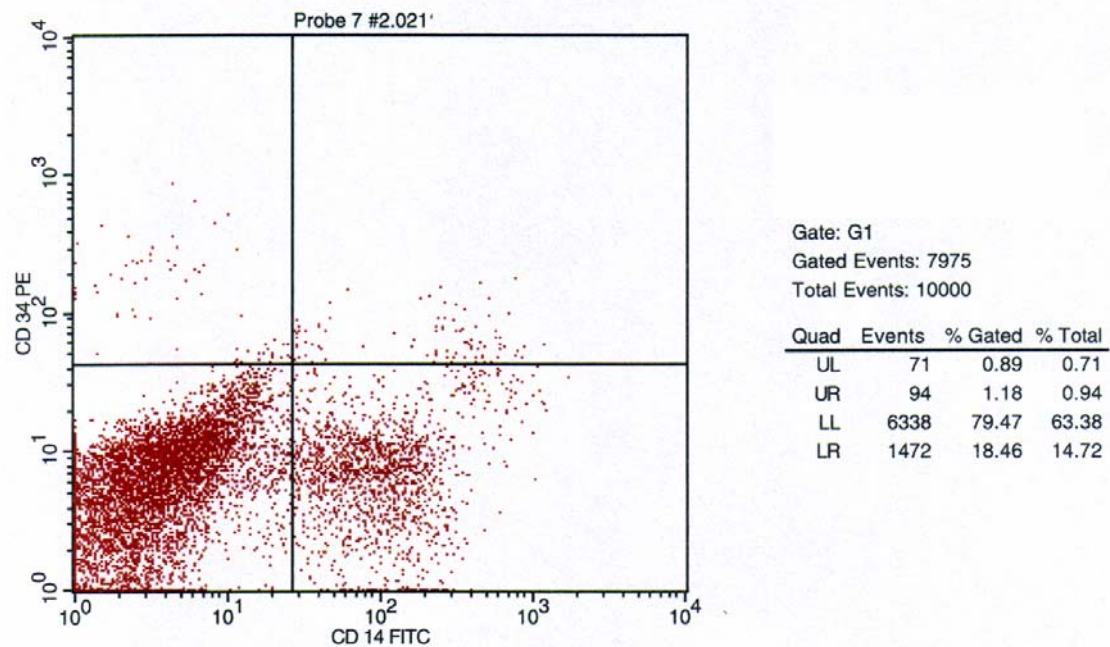


Abb. 53: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 14 positiven Zellen gegen CD 34 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^7 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

3. 4. 2. CD 34

Es folgen die Wertetabellen in Prozent bezogen auf die CD 34 positiven Zellen.

| Patient | Kontrolle | 10⁵ | 10⁶ | 10⁷ |
|----------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| A | 0,600 | 0,860 | 0,540 | 0,310 |
| B | 0,630 | 0,710 | 0,650 | 0,890 |
| C | 0,370 | 0,160 | 1,020 | 0,770 |
| D | 0,000 | 1,160 | 0,900 | 0,970 |

Tab. 32: Die Wertetabelle der 4 Patienten für CD 34 positive Zellen in Prozent am Tag der höchsten Zytokinausschüttung.

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 34 pos. am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-5} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,2530 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.264 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.4000 \pm 0.1454 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-5} | 0.7225 \pm 0.2095 N=4 |
| Difference between means | -0.3225 \pm 0.2551 |
| 95% confidence interval | -0.3016 to 0.9466 |
| R squared | 0,2104 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.076, 3, 3 |
| P value | 0,2819 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 33: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-5} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 34 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0842 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.067 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.4000 \pm 0.1454 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 0.7775 \pm 0.1105 N=4 |
| Difference between means | -0.3775 \pm 0.1826 |
| 95% confidence interval | -0.06941 to 0.8244 |
| R squared | 0,4159 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.733, 3, 3 |
| P value | 0,3314 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 34: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^6 Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 34 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-7} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1570 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.617 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.4000 \pm 0.1454 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-7} | 0.7350 \pm 0.1475 N=4 |
| Difference between means | -0.3350 \pm 0.2071 |
| 95% confidence interval | -0.1719 to 0.8419 |
| R squared | 0,3036 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.029, 3, 3 |
| P value | 0,4910 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 35: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-7} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 34 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,9627 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.04878 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 0.7225 \pm 0.2095 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 0.7350 \pm 0.1475 N=4 |
| Difference between means | -0.01250 \pm 0.2563 |
| 95% confidence interval | -0.6145 to 0.6395 |
| R squared | 0,0003964 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.018, 3, 3 |
| P value | 0,2894 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 36: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^6

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 34 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,9627 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.04878 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 0.7225 \pm 0.2095 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 0.7350 \pm 0.1475 N=4 |
| Difference between means | -0.01250 \pm 0.2563 |
| 95% confidence interval | -0.6145 to 0.6395 |
| R squared | 0,0003964 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.018, 3, 3 |
| P value | 0,2894 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 37: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 34 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^6 and 10^7 |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,8253 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.2306 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 0.7775 \pm 0.1105 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 0.7350 \pm 0.1475 N=4 |
| Difference between means | 0.04250 \pm 0.1843 |
| 95% confidence interval | -0.4935 to 0.4085 |
| R squared | 0,008786 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.783, 3, 3 |
| P value | 0,3233 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 38: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^6 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

Graphische Darstellung der Auswertung der FACS Analyse am Tag des 1. Mediumwechsels

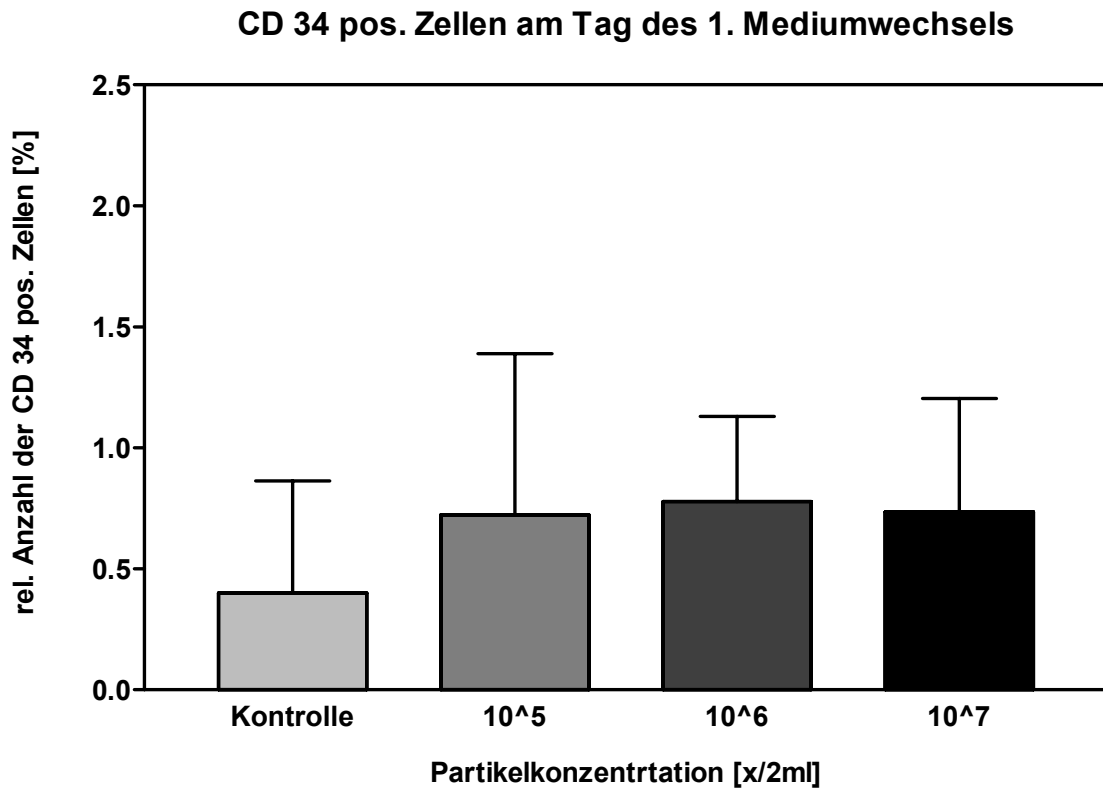


Abb. 54: Graphische Darstellung der Entwicklungen der Zellpopulationen in Prozent bezogen auf die einzelnen Zellkulturen unter Verwendung von UHMW – PE Partikeln in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Es ist zu erkennen, dass die Veränderungen in Richtung der CD 34 positiven Zellen in den Kulturen, die mit Abriebpartikeln versetzt waren gegenüber den Werten der Kontrollkultur keine signifikanten Veränderungen zeigen.

3. 4. 3. CD 66 b

Es folgen die Wertetabellen in Prozent bezogen auf die CD 66b positiven Zellen.

| Patient | Kontrolle | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ |
|---------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| A | 42,240 | 37,320 | 39,630 | 45,480 |
| B | 38,290 | 36,910 | 44,420 | 43,640 |
| C | 36,490 | 34,700 | 45,430 | 42,590 |
| D | 44,110 | 38,610 | 45,780 | 37,370 |

Tab. 39: Die Wertetabelle der 4 Patienten für CD 66b positive Zellen am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 66b pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-5} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1291 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.759 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 40.28 \pm 1.752 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-5} | 36.89 \pm 0.8134 N=4 |
| Difference between means | 3.398 \pm 1.932 |
| 95% confidence interval | -8.124 to 1.329 |
| R squared | 0,3402 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 4.639, 3, 3 |
| P value | 0,1198 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 40: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-5} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 66b pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^6 |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1688 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. Different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.564 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 40.28 \pm 1.752 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 43.82 \pm 1.424 N=4 |
| Difference between means | -3.533 \pm 2.258 |
| 95% confidence interval | -1.993 to 9.058 |
| R squared | 0,2897 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.513, 3, 3 |
| P value | 0,3710 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 41: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^6 Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 66b pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-7} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4515 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.8051 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 40.28 \pm 1.752 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-7} | 42.27 \pm 1.739 N=4 |
| Difference between means | -1.987 \pm 2.469 |
| 95% confidence interval | -4.053 to 8.028 |
| R squared | 0,09750 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.015, 3, 3 |
| P value | 0,4953 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 42: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-7} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 66b pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0055 |
| P value summary | ** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=4.225 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 36.89 \pm 0.8134 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 43.82 \pm 1.424 N=4 |
| Difference between means | -6.930 \pm 1.640 |
| 95% confidence interval | 2.916 to 10.94 |
| R squared | 0,7484 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 3.067, 3, 3 |
| P value | 0,1910 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 43: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^6

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 66b pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0310 |
| P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.805 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 36.89 \pm 0.8134 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 42.27 \pm 1.739 N=4 |
| Difference between means | -5.385 \pm 1.920 |
| 95% confidence interval | 0.6870 to 10.08 |
| R squared | 0,5673 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 4.571, 3, 3 |
| P value | 0,1219 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 44: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

| Parameter | Value |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 66b pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^6 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,5176 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? ($P < 0.05$) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.6873 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 43.82 \pm 1.424 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 42.27 \pm 1.739 N=4 |
| Difference between means | 1.545 \pm 2.248 |
| 95% confidence interval | -7.046 to 3.956 |
| R squared | 0,07298 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.491, 3, 3 |
| P value | 0,3754 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 45: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^6 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

Graphische Darstellung der Auswertung der FACS Analyse am Tag des 1. Mediumwechsels

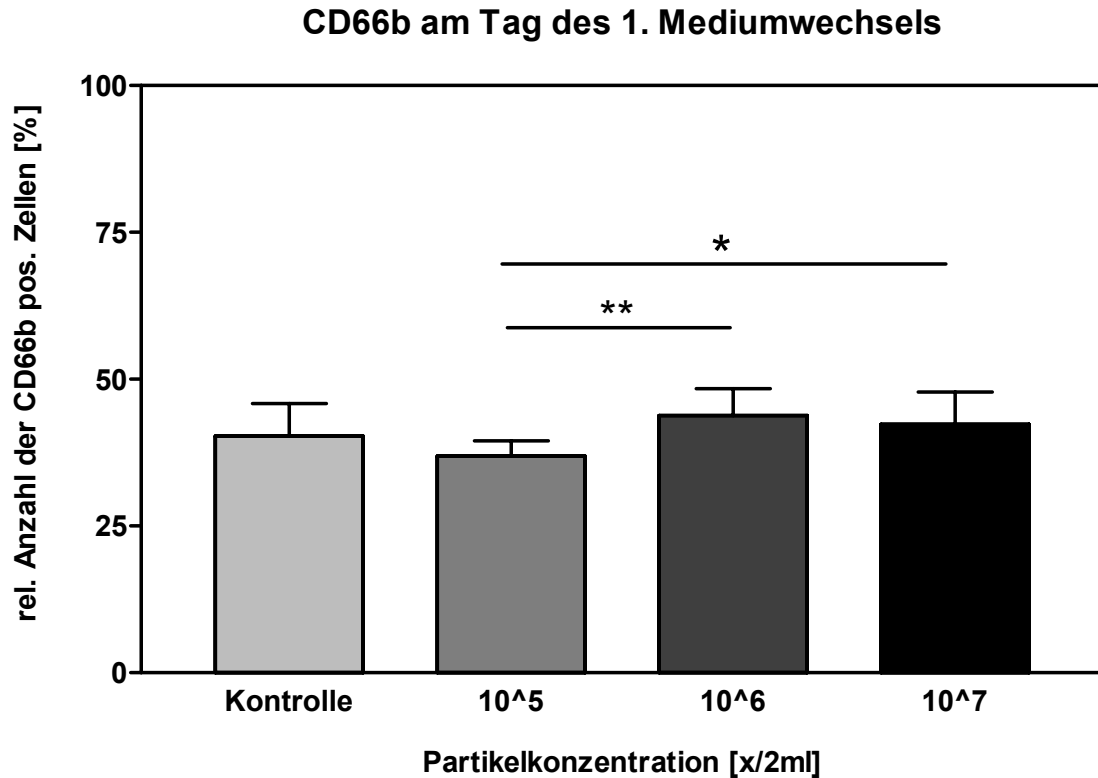


Abb. 55: Graphische Darstellung der Entwicklungen der Zellpopulationen in Prozent bezogen auf die verschiedenen Kulturen unter Verwendung von UHMW – PE Partikeln in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Die Sterne geben das jeweilige Signifikanzniveau an. Es ist zu erkennen, dass die Veränderungen in Richtung der CD 66b positiven Zellen in den Kulturen, die mit Abriebpartikeln versetzt waren gegenüber den Werten der Kontrollkultur keine signifikanten Veränderungen zeigen. Die Kultur welche mit 10⁵ Partikeln versetzt war zeigt allerdings 1 – bis 2 – fach signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Kulturen welche mit 10⁶ und 10⁷ Partikeln versetzt wurden.

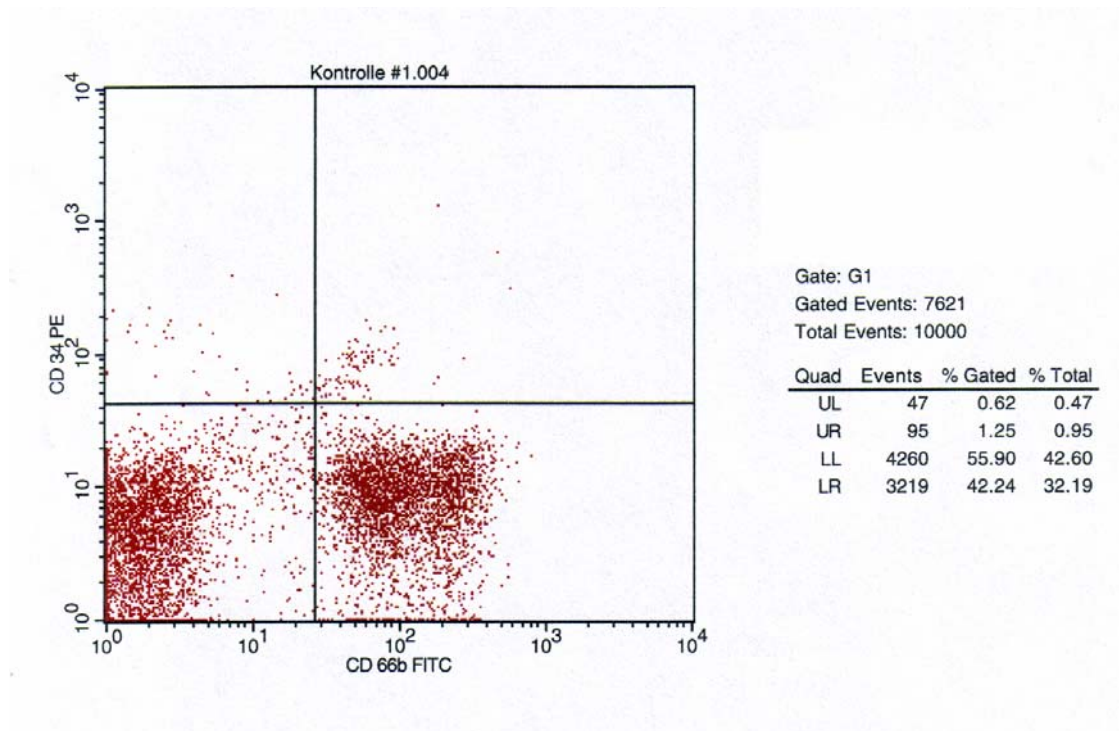


Abb. 56: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 66b positiven Zellen gegen CD – 34 positive Zellen in der Kontrollkultur am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

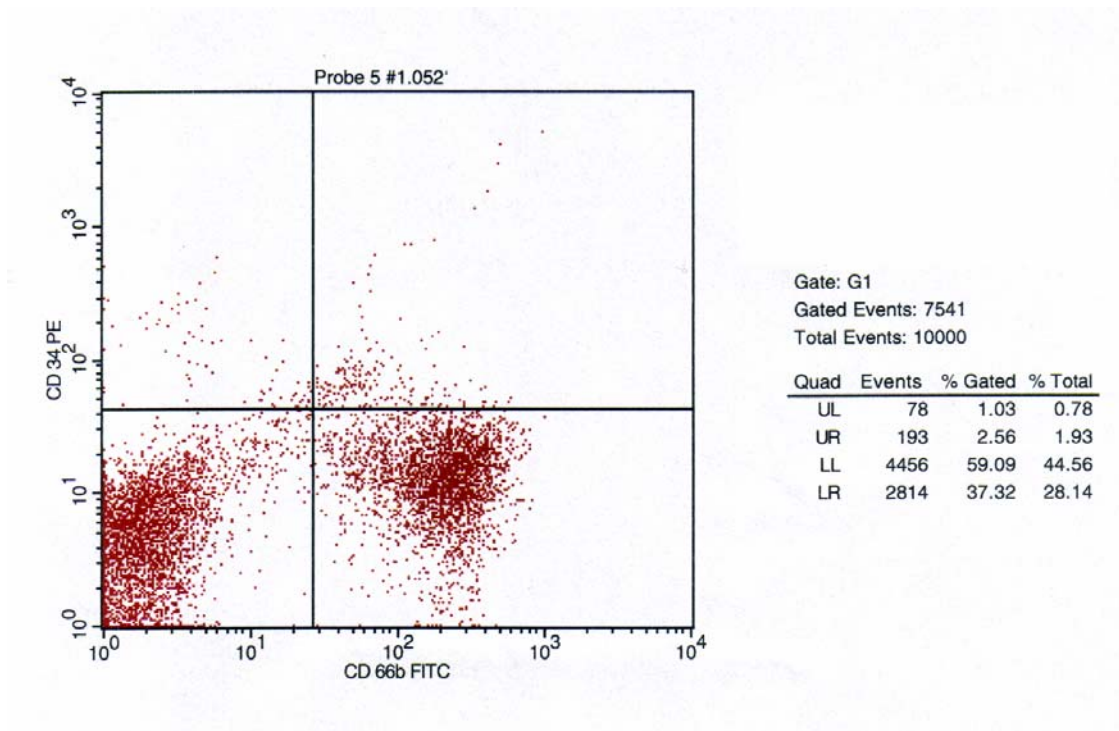


Abb. 57: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 66b positiven Zellen gegen CD – 34 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^5 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

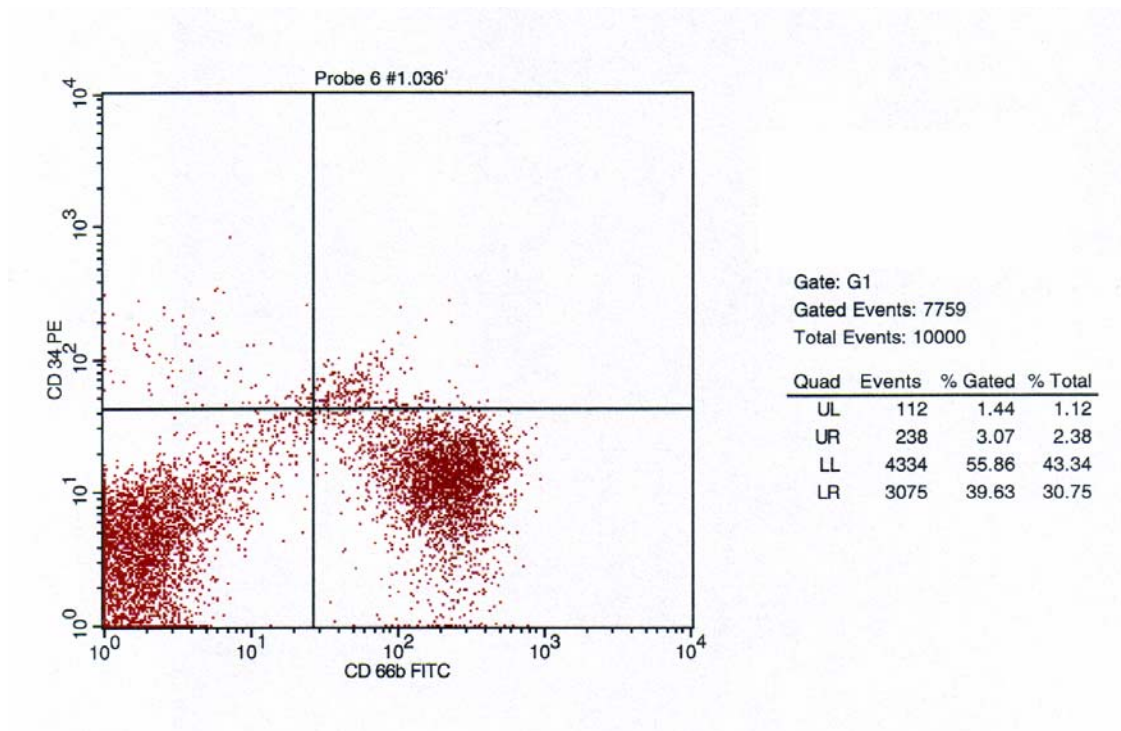


Abb. 58: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 66b positiven Zellen gegen CD 34 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^6 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

3. 4. 4. CD 3 pos. CD 4 pos Zellen (t – Helfer Zellen)

Es folgen die Wertetabellen in Prozent bezogen auf die CD 3 positiven , CD 4 positiven Zellen.

| Patient | Kontrolle | 10^5 | 10^6 | 10^7 |
|---------|-----------|--------|--------|--------|
| A | 0,00 | 1,000 | 1,61 | 1,200 |
| B | 1,12 | 1,670 | 1,07 | 1,750 |
| C | 0,96 | 1,570 | 1,03 | 1,010 |
| D | 0,47 | 1,320 | 1,34 | 1,320 |

Tab. 46: Die Wertetabelle der 4 Patienten für CD 3 positive, CD 4 positive Zellen am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-5} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0431 |
| P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.557 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.6375 \pm 0.2535 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-5} | 1.390 \pm 0.1494 N=4 |
| Difference between means | -0.7525 \pm 0.2943 |
| 95% confidence interval | 0.03244 to 1.473 |
| R squared | 0,5215 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.880, 3, 3 |
| P value | 0,2041 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 47: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-5} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0724 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.177 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.6375 \pm 0.2535 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 1.263 \pm 0.1347 N=4 |
| Difference between means | -0.6250 \pm 0.2871 |
| 95% confidence interval | -0.07755 to 1.328 |
| R squared | 0,4413 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 3.540, 3, 3 |
| P value | 0,1634 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 48: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^6 Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-7} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0620 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? ($P < 0.05$) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.289 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.6375 ± 0.2535 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-7} | 1.320 ± 0.1569 N=4 |
| Difference between means | -0.6825 ± 0.2981 |
| 95% confidence interval | -0.04706 to 1.412 |
| R squared | 0,4662 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.611, 3, 3 |
| P value | 0,2257 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 49: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-7} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,7576 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.3231 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 1.390 \pm 0.1494 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 1.320 \pm 0.1569 N=4 |
| Difference between means | 0.07000 \pm 0.2166 |
| 95% confidence interval | -0.6001 to 0.4601 |
| R squared | 0,01710 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.103, 3, 3 |
| P value | 0,4688 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 50: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,7576 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.3231 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 1.390 \pm 0.1494 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 1.320 \pm 0.1569 N=4 |
| Difference between means | 0.07000 \pm 0.2166 |
| 95% confidence interval | -0.6001 to 0.4601 |
| R squared | 0,01710 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.103, 3, 3 |
| P value | 0,4688 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 51: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^6

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^6 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,7903 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.2780 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 1.263 \pm 0.1347 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 1.320 \pm 0.1569 N=4 |
| Difference between means | -0.0575 \pm 0.2068 |
| 95% confidence interval | -0.4486 to 0.5636 |
| R squared | 0,01272 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.356, 3, 3 |
| P value | 0,4042 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 52: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^6 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

Graphische Darstellung der Auswertung der FACS Analyse am Tag des 1. Mediumwechsels

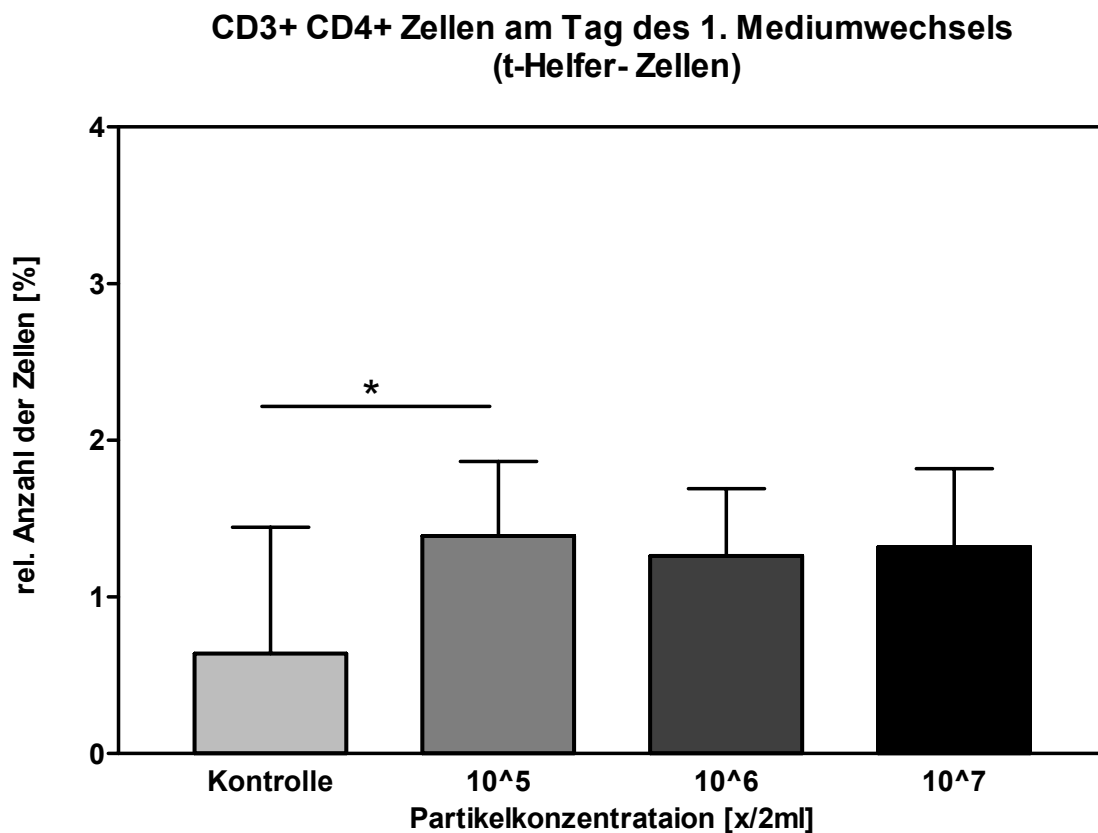


Abb. 59: Graphische Darstellung der Entwicklungen der Zellpopulationen in Prozent bezogen auf die Zellkulturen unter Verwendung von UHMW – PE Partikeln in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Der Stern zeigt das Signifikanzniveau an. Es ist zu erkennen, dass die Veränderungen in Richtung der CD 3 positiven CD 4 positiven Zellen in den Kulturen, die mit 10⁶ und 10⁷ Abriebpartikeln versetzt waren gegenüber den Werten der Kontrollkultur keine signifikanten Veränderungen zeigen. Lediglich bei einer Konzentration von 10⁵ Partikeln ist eine 1 – fach signifikante Veränderung in Richtung der CD 3 positiven CD 4 positiven Zellen.

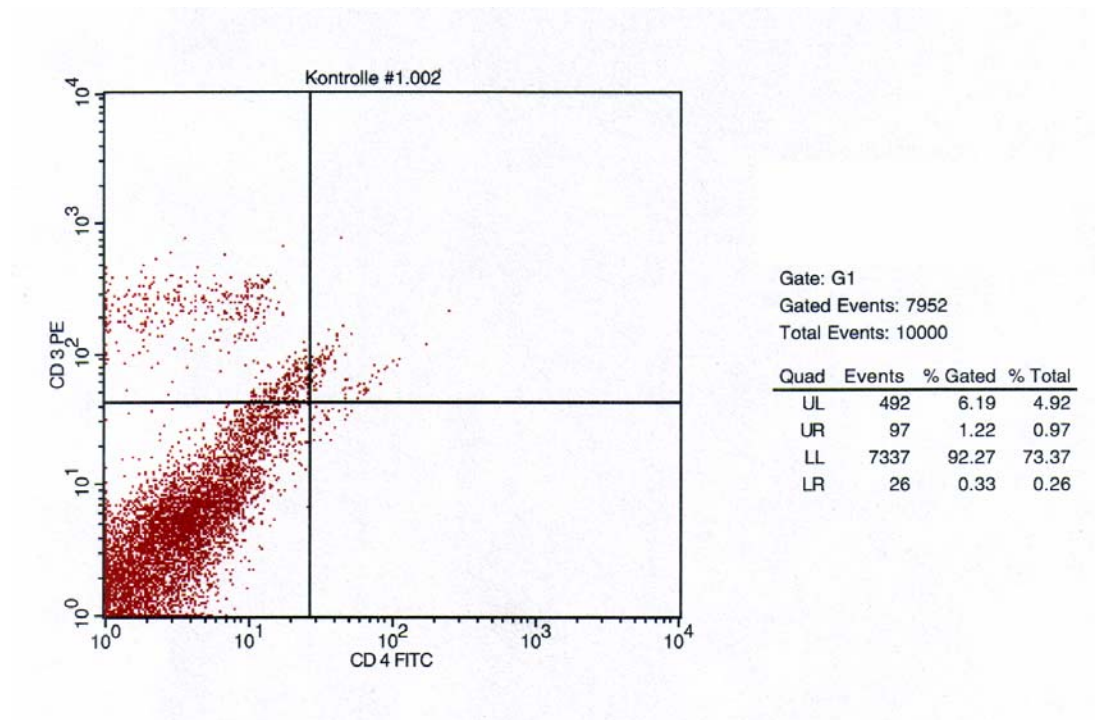


Abb. 60: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 3 positiven gegen die CD 4 positiven Zellen in der Kontrollkultur am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

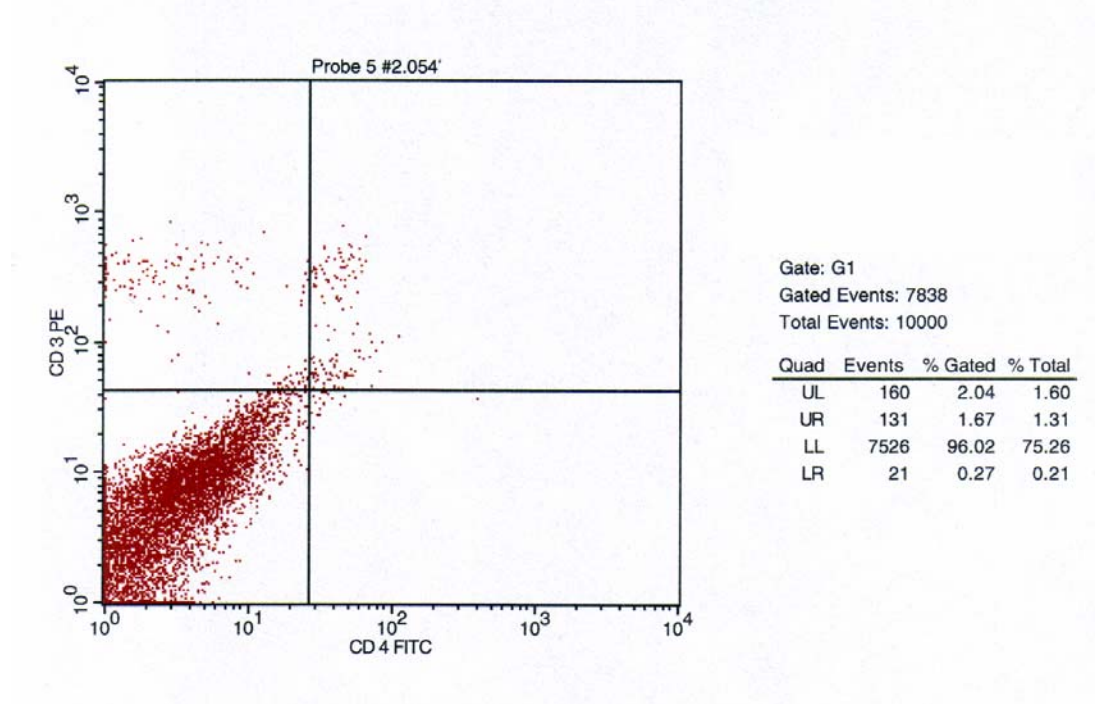


Abb. 61: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 3 positiven gegen die CD 4 positiven Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^{-5} Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

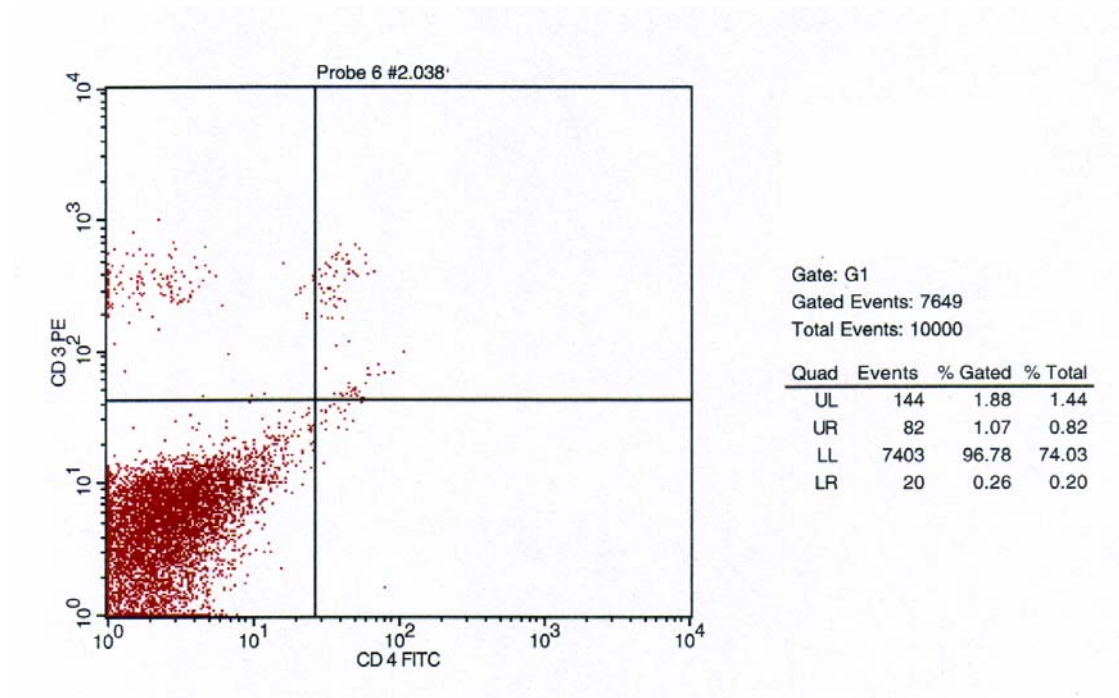


Abb. 62: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 3 positiven gegen die CD 4 positiven Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^6 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

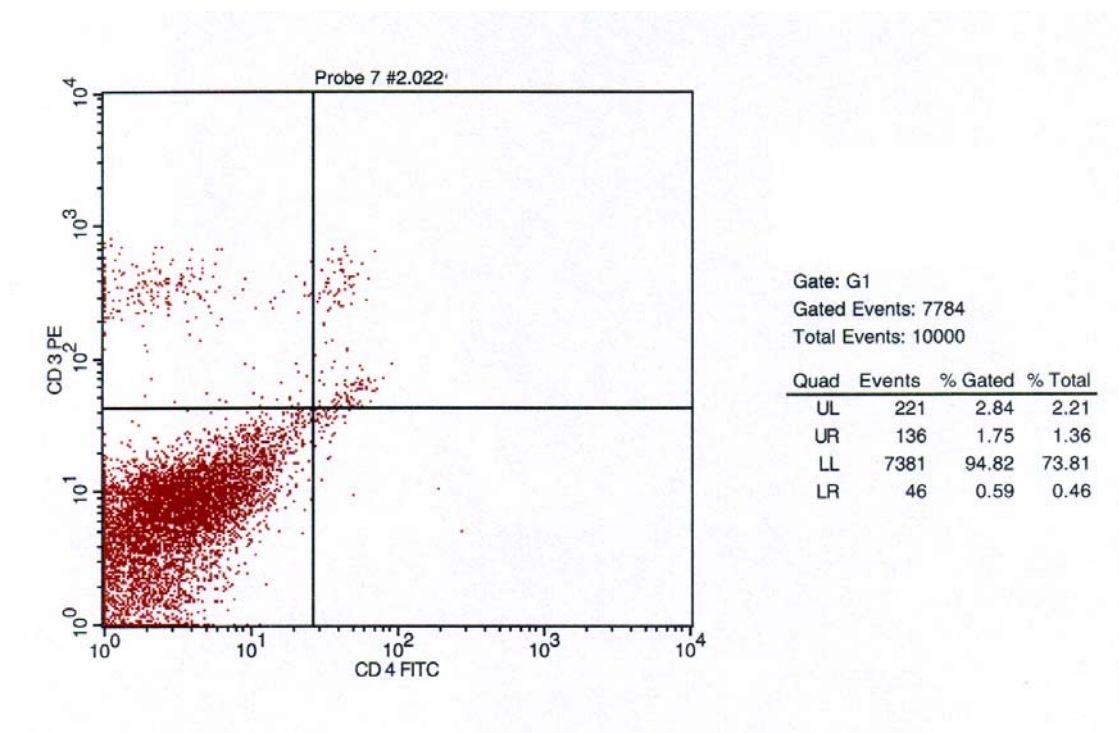


Abb. 63: Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 3 positiven gegen die CD 4 positiven Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^7 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

3. 4. 5. CD 3 pos. CD 4 neg. Zellen (zytotoxische Zellen)

Es folgen die Wertetabellen in Prozent bezogen auf die CD 3 positiven CD 4 negative Zellen.

| Patient | Kontrolle | 10⁵ | 10⁶ | 10⁷ |
|----------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| A | 2,990 | 3,430 | 3,060 | 3,060 |
| B | 2,020 | 2,040 | 1,880 | 1,880 |
| C | 1,700 | 1,820 | 1,900 | 1,900 |
| D | 1,710 | 1,690 | 2,220 | 2,220 |

Tab. 53: Die Wertetabelle der 4 Patienten in Prozent für CD 3 positive, CD 4 negative Zellen am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 neg. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-5} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,7904 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.2779 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 2.105 \pm 0.3042 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-5} | 2.245 \pm 0.4015 N=4 |
| Difference between means | -0.1400 \pm 0.5038 |
| 95% confidence interval | -1.093 to 1.373 |
| R squared | 0,01271 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.742, 3, 3 |
| P value | 0,3298 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 54: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-5} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 neg. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,7104 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.3894 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 2.105 \pm 0.3042 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 2.265 \pm 0.2762 N=4 |
| Difference between means | -0.1600 \pm 0.4109 |
| 95% confidence interval | -0.8455 to 1.165 |
| R squared | 0,02465 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.213, 3, 3 |
| P value | 0,4388 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 55: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^6 Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 neg. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-7} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,7104 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.3894 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 2.105 \pm 0.3042 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-7} | 2.265 \pm 0.2762 N=4 |
| Difference between means | -0.1600 \pm 0.4109 |
| 95% confidence interval | -0.8455 to 1.165 |
| R squared | 0,02465 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.213, 3, 3 |
| P value | 0,4388 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 56: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-7} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 neg. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,9686 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.04104 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 2.245 \pm 0.4015 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 2.265 \pm 0.2762 N=4 |
| Difference between means | -0.02000 \pm 0.4874 |
| 95% confidence interval | -1.173 to 1.213 |
| R squared | 0,0002806 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.113, 3, 3 |
| P value | 0,2773 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 57: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^6

| Parameter | Value |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 neg. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^7 |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,9686 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? ($P < 0.05$) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.04104 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 2.245 \pm 0.4015 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 2.265 \pm 0.2762 N=4 |
| Difference between means | -0.02000 \pm 0.4874 |
| 95% confidence interval | -1.173 to 1.213 |
| R squared | 0,0002806 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.113, 3, 3 |
| P value | 0,2773 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 58: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 3 pos. / CD 4 neg. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^6 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 1,0000 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.0000 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 2.265 \pm 0.2762 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 2.265 \pm 0.2762 N=4 |
| Difference between means | 0.0000 \pm 0.3906 |
| 95% confidence interval | -0.9558 to 0.9558 |
| R squared | 0,0000 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.000, 3, 3 |
| P value | 0,5000 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 59: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^6 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

**Graphische Darstellung der Auswertung der FACS Analyse am Tag des
1. Mediumwechsels**

**CD3 pos./ CD4 neg. Zellen am Tag des 1.
Mediumwechsels (zytotox. T-Zellen)**

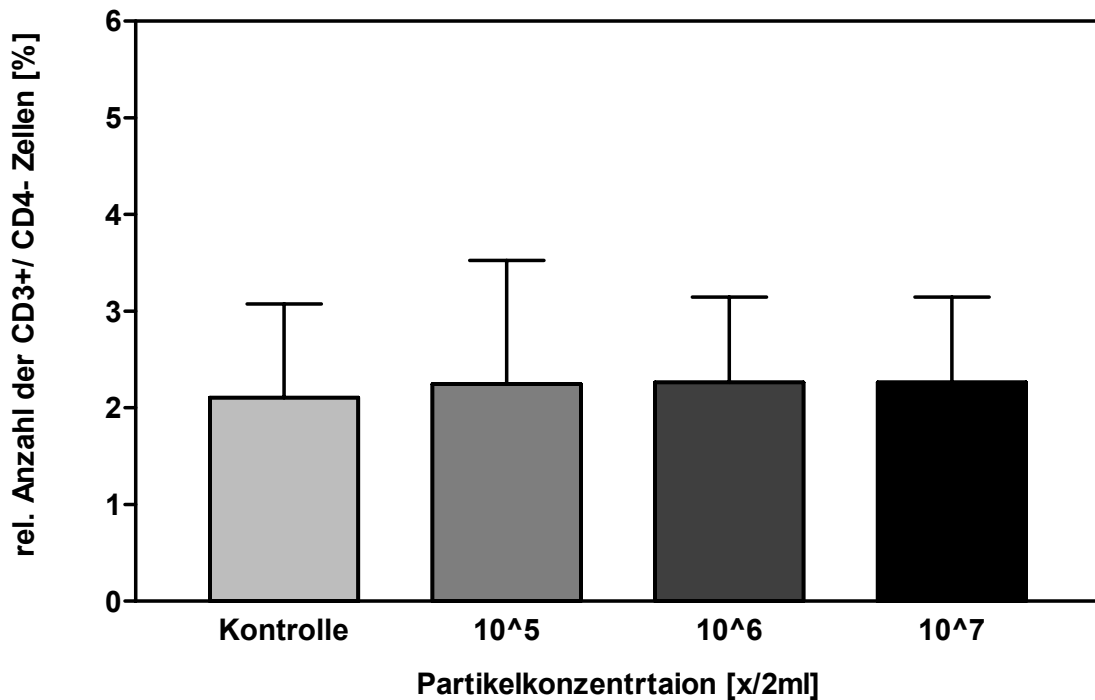


Abb. 64: Graphische Darstellung der Entwicklungen der Zellpopulationen in Prozent bezogen auf die Zellkulturen unter Verwendung von UHMW – PE Partikeln in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Es ist zu erkennen, das die Veränderungen in Richtung der CD 3 positiven CD 4 negativen Zellen in den Kulturen, die mit Abriebpartikeln versetzt waren gegenüber den Werten der Kontrollkultur keine signifikanten Veränderungen zeigen.

3. 4. 6. CD 19

Es folgen die Wertetabellen in Prozent bezogen auf die CD 19 positiven Zellen.

| Patient | Kontrolle | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ |
|---------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| A | 0,610 | 0,250 | 0,150 | 0,240 |
| B | 0,540 | 0,315 | 0,300 | 0,190 |
| C | 0,650 | 0,320 | 0,200 | 0,290 |
| D | 0,650 | 0,190 | 0,240 | 0,170 |

Tab. 60: Die Wertetabelle der 4 Patienten in Prozent für CD 19 positive Zellen am Tag der höchsten Zytokinausschüttung.

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD19 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-5} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0001 |
| P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=8.551 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.6125 \pm 0.02594 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-5} | 0.2688 \pm 0.03071 N=4 |
| Difference between means | 0.3438 \pm 0.04020 |
| 95% confidence interval | -0.4421 to -0.2454 |
| R squared | 0,9242 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.402, 3, 3 |
| P value | 0,3940 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 61: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-5} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD19 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10⁶ |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | P<0.0001 |
| P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=9.517 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column Kontrolle | 0.6125 ± 0.02594 N=4 |
| Mean ± SEM of column 10⁶ | 0.2225 ± 0.03172 N=4 |
| Difference between means | 0.3900 ± 0.04098 |
| 95% confidence interval | -0.4903 to -0.2897 |
| R squared | 0,9379 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.495, 3, 3 |
| P value | 0,3745 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 62: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10⁶ Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD19 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-7} |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | $P < 0.0001$ |
| P value summary | *** |
| Are means signif. different? ($P < 0.05$) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | $t=10.44$ $df=6$ |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.6125 ± 0.02594 $N=4$ |
| Mean \pm SEM of column 10^{-7} | 0.2225 ± 0.02689 $N=4$ |
| Difference between means | 0.3900 ± 0.03736 |
| 95% confidence interval | -0.4814 to -0.2986 |
| R squared | 0,9478 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.074, 3, 3 |
| P value | 0,4772 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 63: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-7} Partikel im Medium

*Graphische Darstellung der Auswertung der FACS Analyse am Tag des
1. Mediumwechsels*

CD19 pos. Zellen nach 3 Tagen

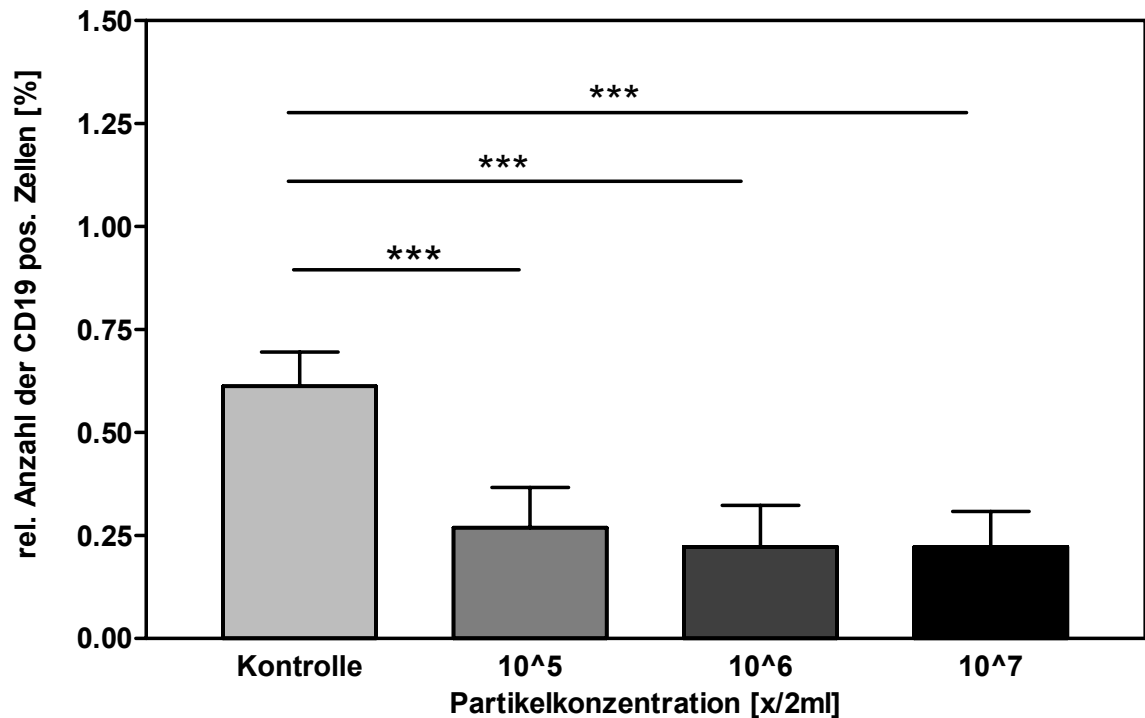


Abb. 65: Graphische Darstellung der Entwicklungen der Zellpopulationen in Prozent bezogen auf die Kulturen unter Verwendung von UHMW – PE Partikeln in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Die Sterne zeigen das jeweilige Signifikanzniveau an. Es ist zu erkennen, dass die Veränderungen in Richtung der CD 19 positiven Zellen in den Kulturen, die mit Abriebpartikeln versetzt waren 3 – fach signifikant gegenüber den Werten der Kontrollkultur sind

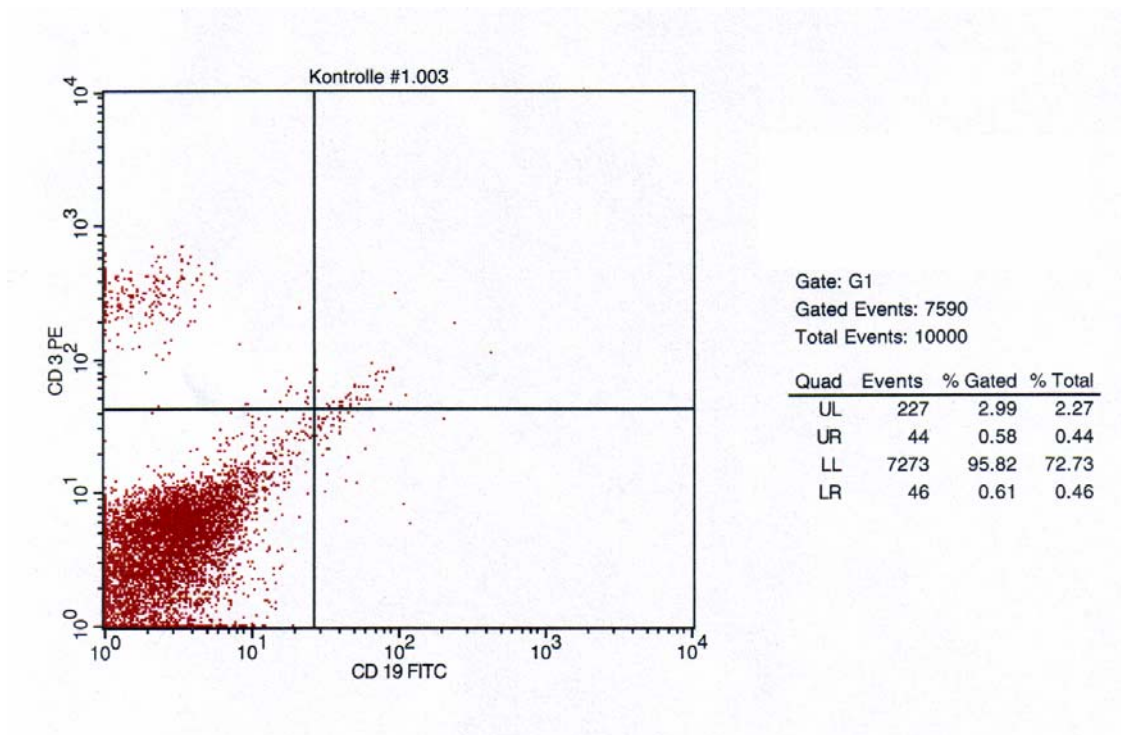


Abb. 66 Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 19 positiven Zellen gegen CD 3 positive Zellen in der Kontrollkultur am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

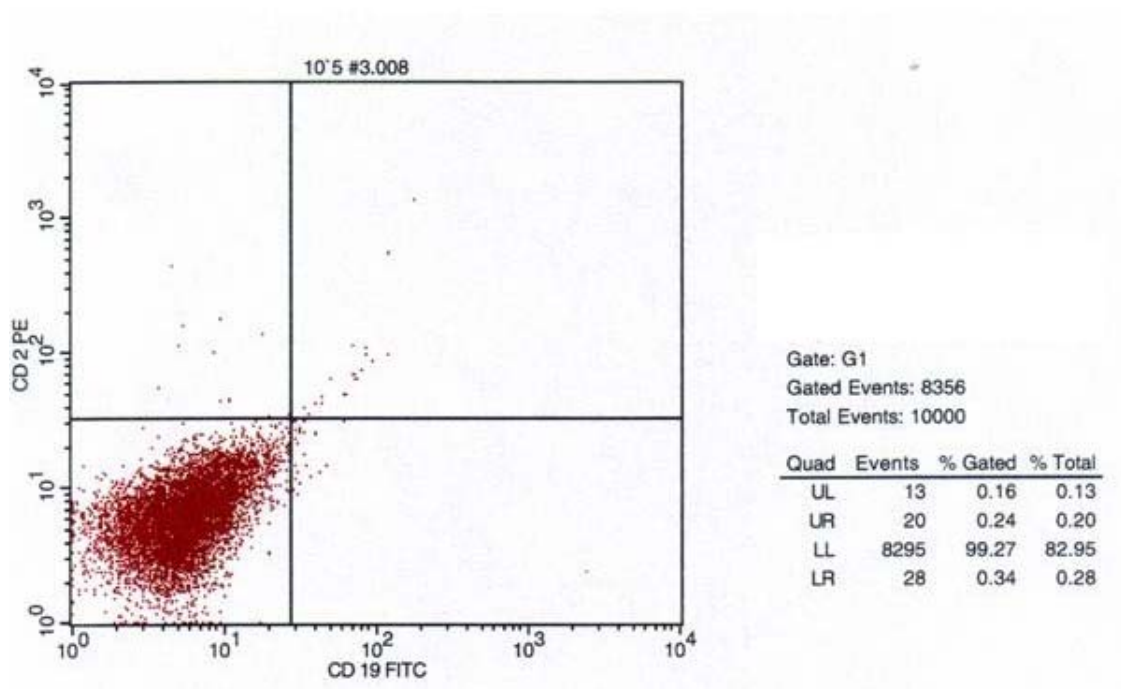


Abb. 67 Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 19 positiven Zellen gegen CD 2 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10⁵ Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

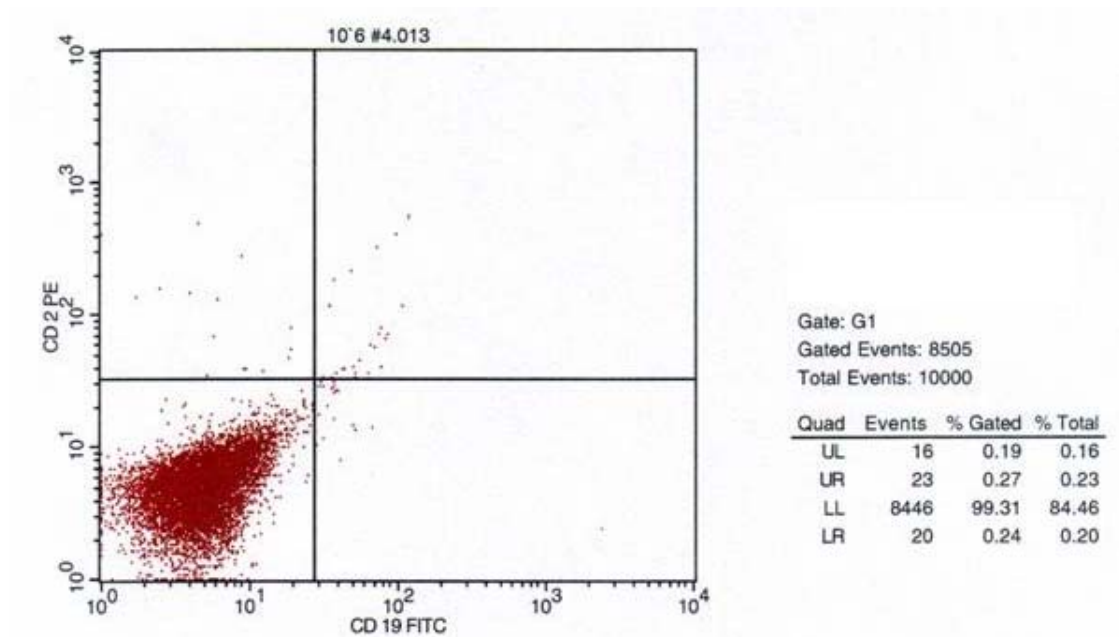


Abb. 68 Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 19 positiven Zellen gegen CD 2 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^6 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

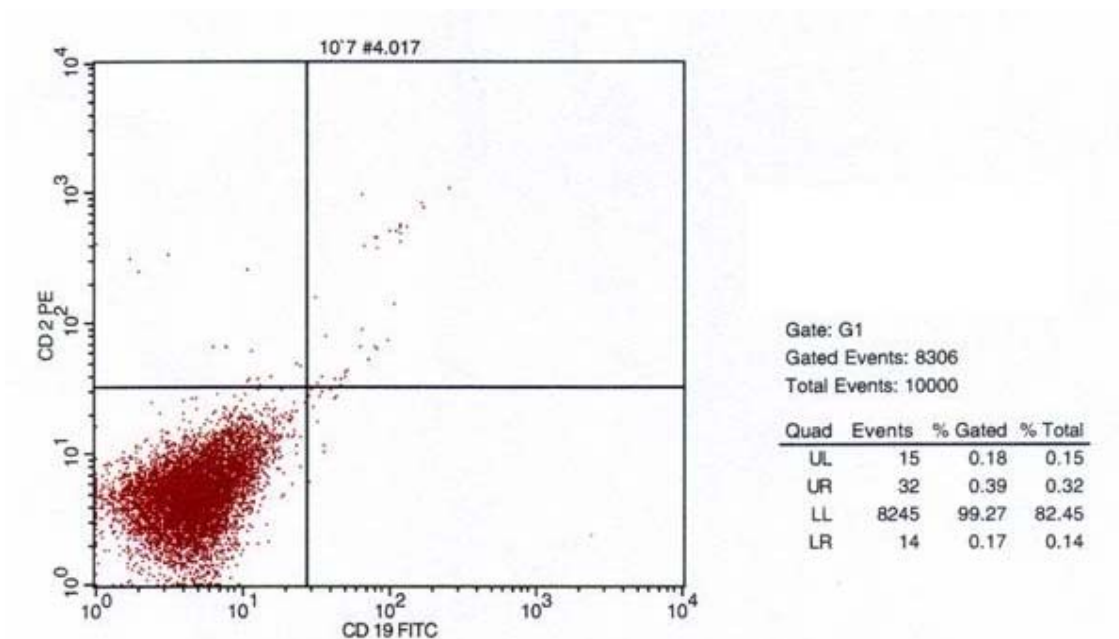


Abb. 69 Graphische Darstellung der FACS – Analyse als Dot Blot der CD 19 positiven Zellen gegen CD 2 positive Zellen in der Kultur unter Verwendung von 10^7 Partikeln am Tag der höchsten Zytokinausschüttung

3. 4. 7. *CD 2*

Es folgen die Wertetabellen in Prozent bezogen auf die CD 2 positiven Zellen.

| Patient | Kontrolle | 10⁵ | 10⁶ | 10⁷ |
|----------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| A | 0,340 | 0,390 | 0,050 | 0,100 |
| B | 0,600 | 0,350 | 0,070 | 0,150 |
| C | 0,680 | 0,130 | 0,060 | 0,050 |
| D | 0,300 | 0,300 | 0,190 | 0,180 |

Tab. 64: Die Wertetabelle der 4 Patienten in Prozent für CD 2 positive Zellen am Tag der höchsten Zytokinausschüttung.

| Parameter | Value |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 2 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-5} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1397 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? ($P < 0.05$) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.702 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.4800 \pm 0.09416 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-5} | 0.2925 \pm 0.05721 N=4 |
| Difference between means | 0.1875 \pm 0.1102 |
| 95% confidence interval | -0.4571 to 0.08211 |
| R squared | 0,3255 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.709, 3, 3 |
| P value | 0,2174 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 65: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-5} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 2 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0081 |
| P value summary | ** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3.887 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.4800 \pm 0.09416 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 0.0925 \pm 0.03276 N=4 |
| Difference between means | 0.3875 \pm 0.09970 |
| 95% confidence interval | -0.6315 to -0.1435 |
| R squared | 0,7157 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 8.264, 3, 3 |
| P value | 0,0582 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 66: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^6 Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 2 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns Kontrolle and 10^{-7} |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0106 |
| P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3.658 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column Kontrolle | 0.4800 \pm 0.09416 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^{-7} | 0.1200 \pm 0.02858 N=4 |
| Difference between means | 0.3600 \pm 0.09840 |
| 95% confidence interval | -0.6008 to -0.1192 |
| R squared | 0,6905 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 10.86, 3, 3 |
| P value | 0,0405 |
| P value summary | * |
| Are variances significantly different? | Yes |

Tab. 67: Wertetabelle für die Auswertung der Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten für 10^{-7} Partikel im Medium

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 2 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^6 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0230 |
| P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3.034 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 0.2925 \pm 0.05721 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 0.0925 \pm 0.03276 N=4 |
| Difference between means | 0.2000 \pm 0.06592 |
| 95% confidence interval | -0.3613 to -0.03869 |
| R squared | 0,6054 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 3.050, 3, 3 |
| P value | 0,1921 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 68: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^6

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 2 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^5 and 10^7 |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0357 |
| P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.697 df=6 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^5 | 0.2925 \pm 0.05721 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 0.1200 \pm 0.02858 N=4 |
| Difference between means | 0.1725 \pm 0.06395 |
| 95% confidence interval | -0.3290 to -0.01601 |
| R squared | 0,5481 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 4.008, 3, 3 |
| P value | 0,1421 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 69: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^5 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

| Parameter | Value |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Table Analyzed | CD 2 pos. Zellen am Tag des 1. Mediumwechsels Columns 10^6 and 10^7 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,5503 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0.6326 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column 10^6 | 0.0925 \pm 0.03276 N=4 |
| Mean \pm SEM of column 10^7 | 0.1200 \pm 0.02858 N=4 |
| Difference between means | -0.0275 \pm 0.04347 |
| 95% confidence interval | -0.07887 to 0.1339 |
| R squared | 0,06253 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.314, 3, 3 |
| P value | 0,4139 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

Tab. 70: Wertetabelle für den Vergleich der Werte für die Partikelkonzentrationen 10^6 mit den Werten für die Partikelkonzentration 10^7

Graphische Darstellung der Auswertung der FACS Analyse am Tag des 1. Mediumwechsels

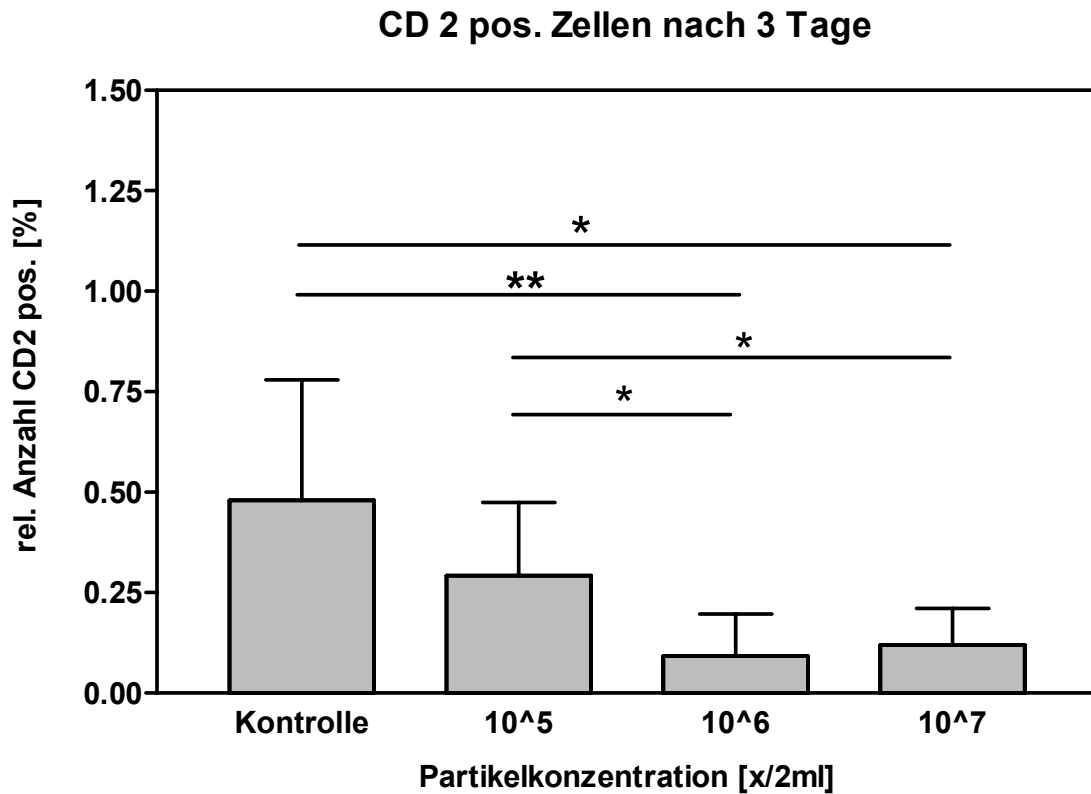


Abb. 70: Graphische Darstellung der Entwicklungen der Zellpopulationen in Prozent bezogen auf die Kulturen unter Verwendung von UHMW – PE Partikeln in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Die Sterne geben das Signifikanzniveau an. Es ist zu erkennen, dass die Veränderungen in Richtung der CD 2 positiven Zellen in den Kulturen, die mit Abriebpartikeln versetzt waren 1 – bis 2 – fach signifikant gegenüber den Werten der Kontrollkultur sind. Der Vergleich der einzelnen Kulturen mit Abriebpartikeln zeigt eine 1 – fach signifikant höhere Anzahl an CD 2 positiven Zellen in der Kultur

mit 10⁵ Partikeln gegenüber den Kulturen mit 10⁶ und 10⁷ Partikeln

Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS – Analyse

Die durchflußzytometrische Untersuchung der Zellkulturen am Tag der höchsten Zytokinausschüttung ergab für einzelne untersuchte Zellpopulationen in den Kulturen in den Abriebpartikel verwendet wurden signifikante Veränderungen im Vergleich zu der Kontrollkultur.

Für die CD 14 positiven Zellen konnten wir eine dreifach signifikante Zunahme dieser Zellen in den Kulturen, welche mit Abriebpartikeln versetzt wurden gegenüber der Kontrollkultur feststellen.

Bei den CD – 19 positiven Zellen lies sich im Gegensatz dazu eine dreifach signifikante Abnahme der Zellen in den Kulturen mit Abriebpartikeln im Vergleich zur Kontrollkultur feststellen.

Die CD – 2 positiven Zellen zeigten eine einfach signifikante Abnahme in den Kulturen mit Abriebpartikeln im Vergleich zur Kontrollkultur.

Die CD 34 positiven Zellen zeigten keine signifikante Veränderung in den Kulturen mit Abriebpartikeln im Vergleich zur Kontrollkultur.

Bei den CD 66b positiven Zellen zeigten sich lediglich im Vergleich der Kulturen mit Abriebpartikeln untereinander statistisch signifikante Veränderungen.

Sowohl bei den CD 3 positiven CD 4 negativen als auch bei den CD 3 positiven CD 4 positiven Zellen haben sich bei der durchflußzytometrischen Untersuchung bis auf eine 1 – fach signifikante Veränderung in der Kultur unter Verwendung von 10^5 Partikeln bei den CD 3 CD 4 positiven Zellen keine statistisch signifikanten Veränderungen in den Kulturen mit Abriebpartikeln im Vergleich zu den Kontrollkulturen ergeben.

3. 5. Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Zellkultur nach 14 Tagen

Einige der verwendeten Zellkulturen wurden auf quadratische Glasdeckplättchen ausgesät, um dann am Ende des Beobachtungszeitraumes von zwei Wochen unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet werden zu können.

Die Aufnahmen zeigen, dass sich die verwendeten UHMW – PE Partikel auf derselben Ebene befunden haben wie die in der Knochenmarkspräparation gewonnenen Knochenmarkszellen, die dann in 6 – Well – Platten ausgesät wurden.

Durch den Kontakt über den Beobachtungszeitraum konnten die Partikel von den Zellen phagozytiert werden.

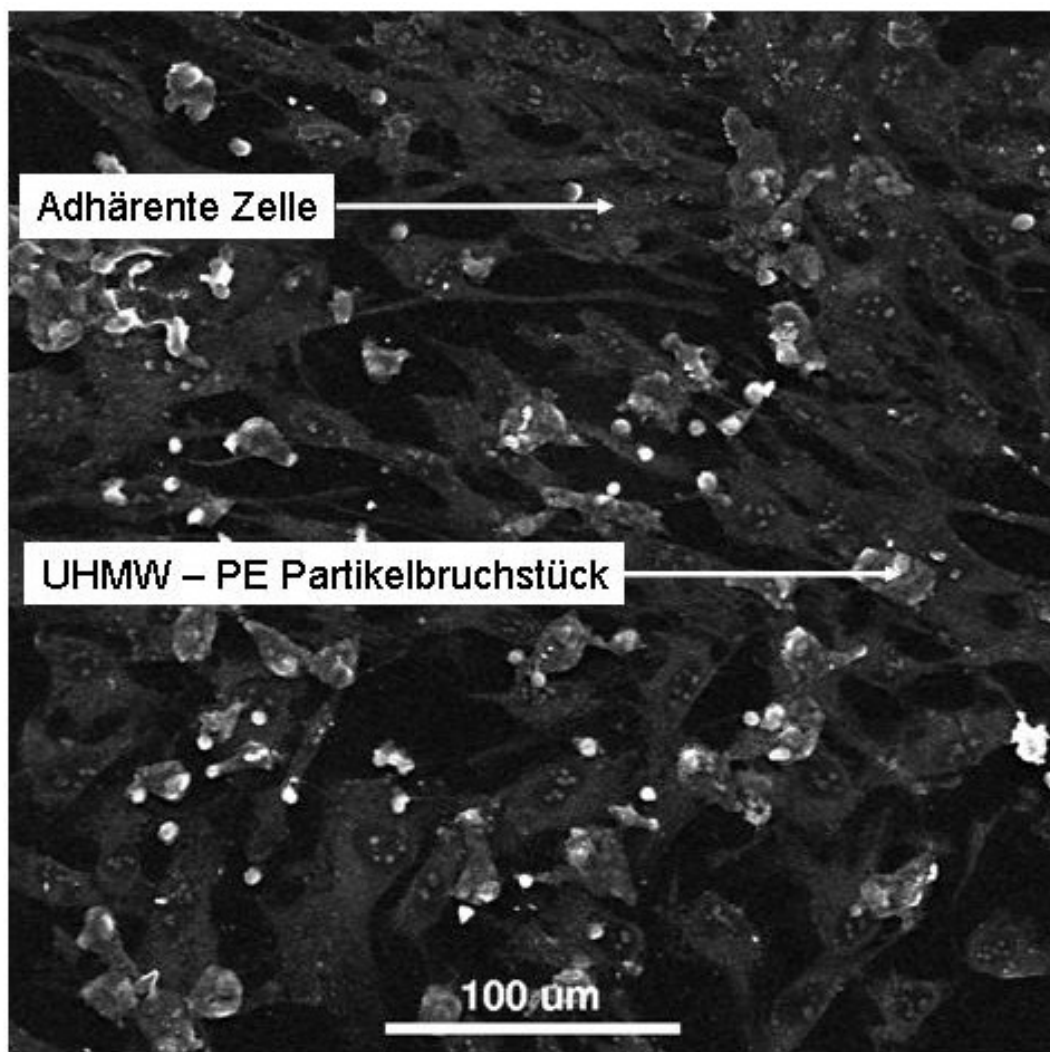


Abb. 71: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der Zellkultur nach Exposition mit UHMW – PE Partikel nach einer Expositionsdauer von 14 Tagen.

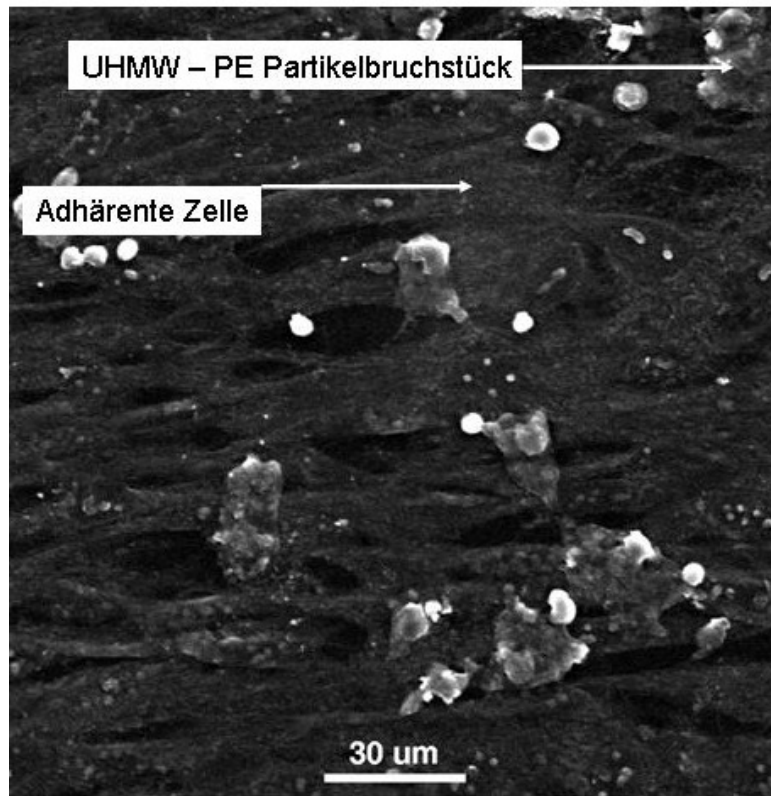


Abb.72: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zellkultur 14 Tage nach Exposition mit UHMW – PE Partikeln.

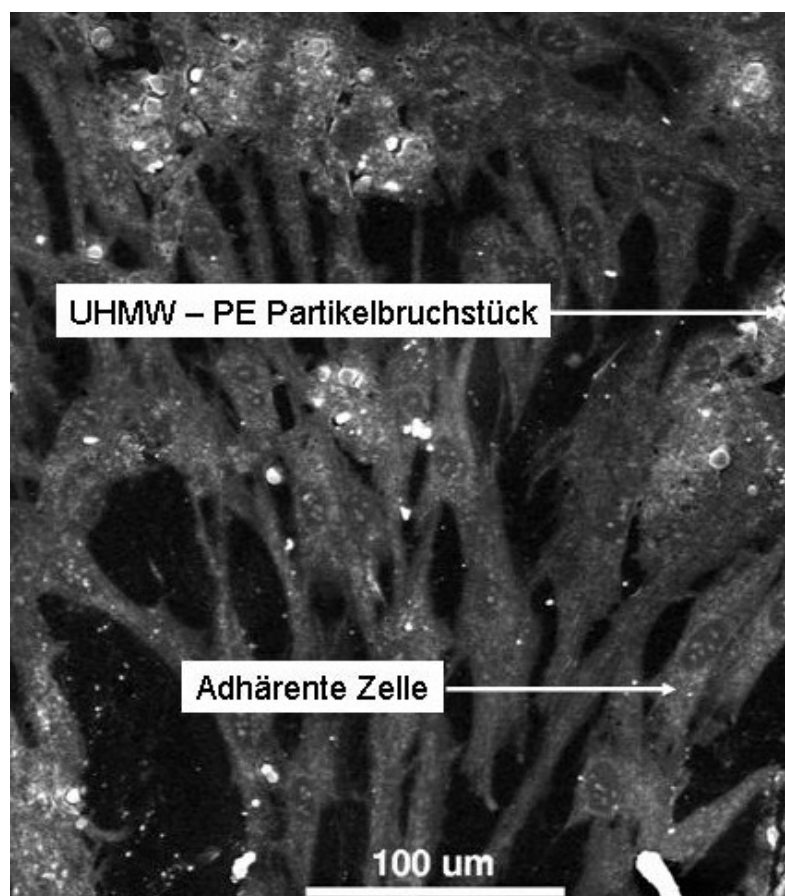
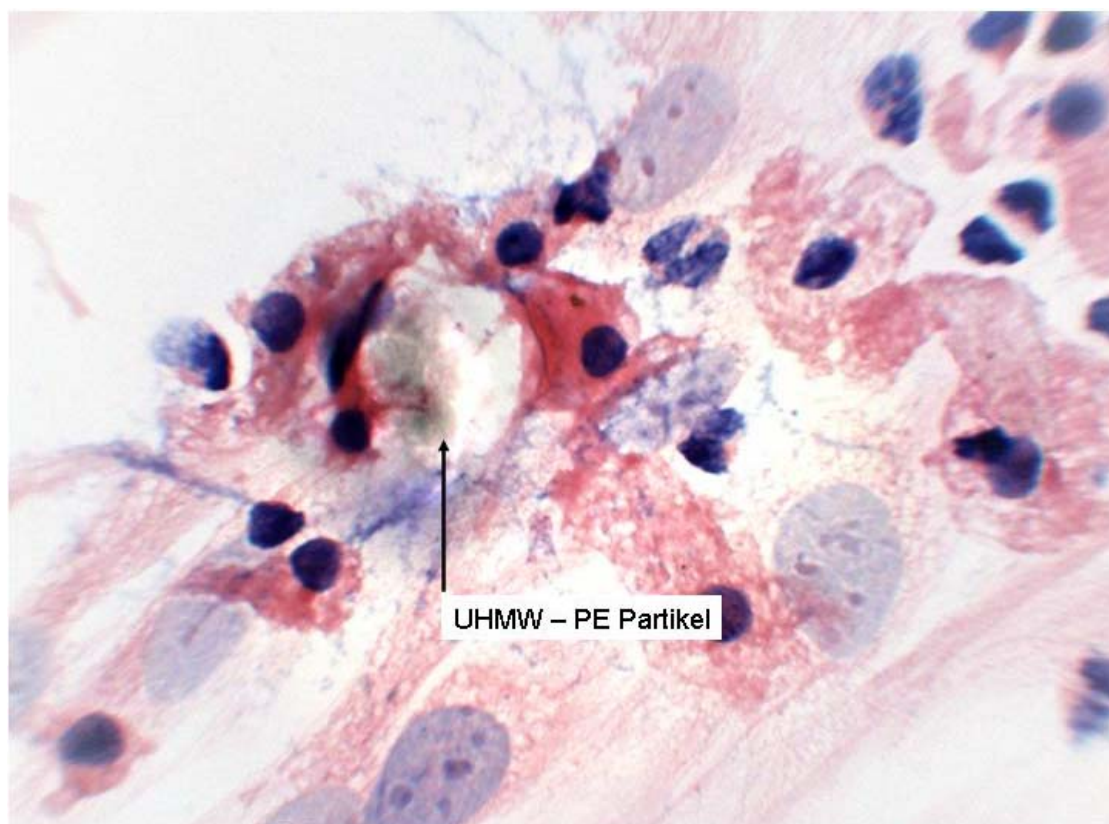


Abb.73: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zellkultur 14 Tage nach Exposition mit UHMW – PE Partikeln

3. 6. Giemsa – gefärbte Bilder der Zellkultur nach 14 Tagen

Einige der Zellkulturen wurden mit Giemsa angefärbt, um einen besseren Kontrast zwischen der Interzellulärsubstanz der Zellen und dem umliegenden Gewebe zu schaffen.

Die Auswertung der Bilder zeigt, dass die ausgesäten Knochenmarkszellen die verwendeten UHMW – PE Partikel über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen phagozytiert haben.



*Abb. 74: Giemsa gefärbte Zellkultur nach 14 Tagen in 1000 – facher Vergrößerung mit Öl – Immersion:
Die Knochenmarkszellen haben sich um ein grünlich dargestelltes Konglomerat von UHMW – PE
Partikeln herum gruppiert.*

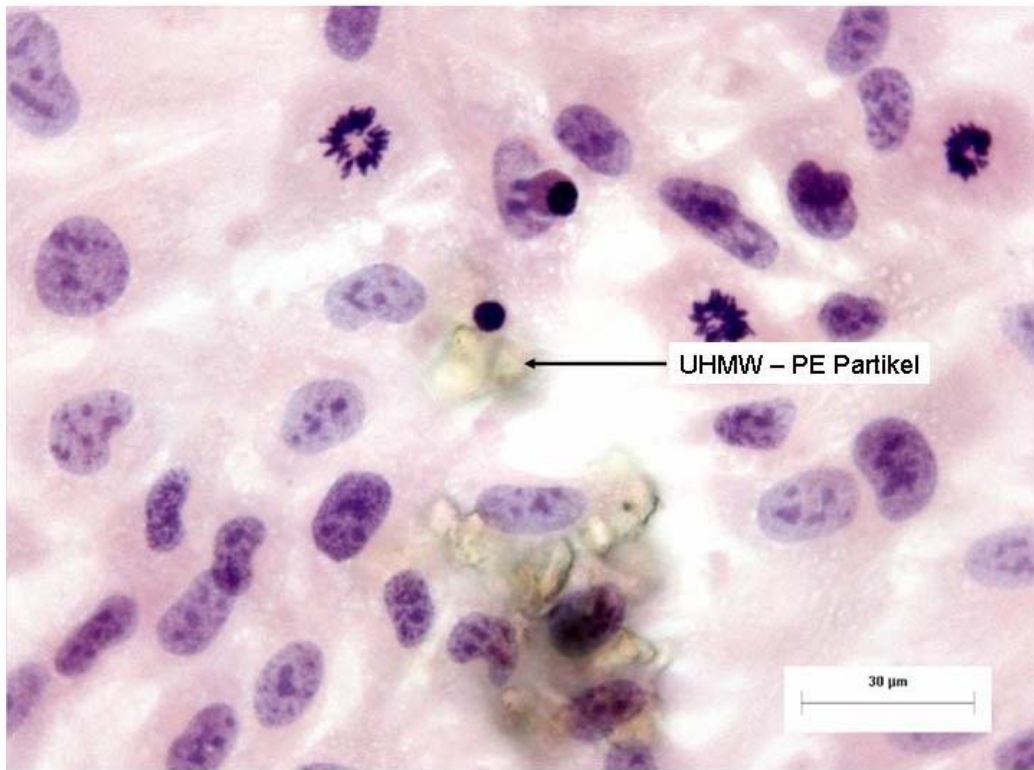


Abb. 75: Giemsa gefärbte Zellkultur. In grau zu erkennen die UHMW – PE Partikel.

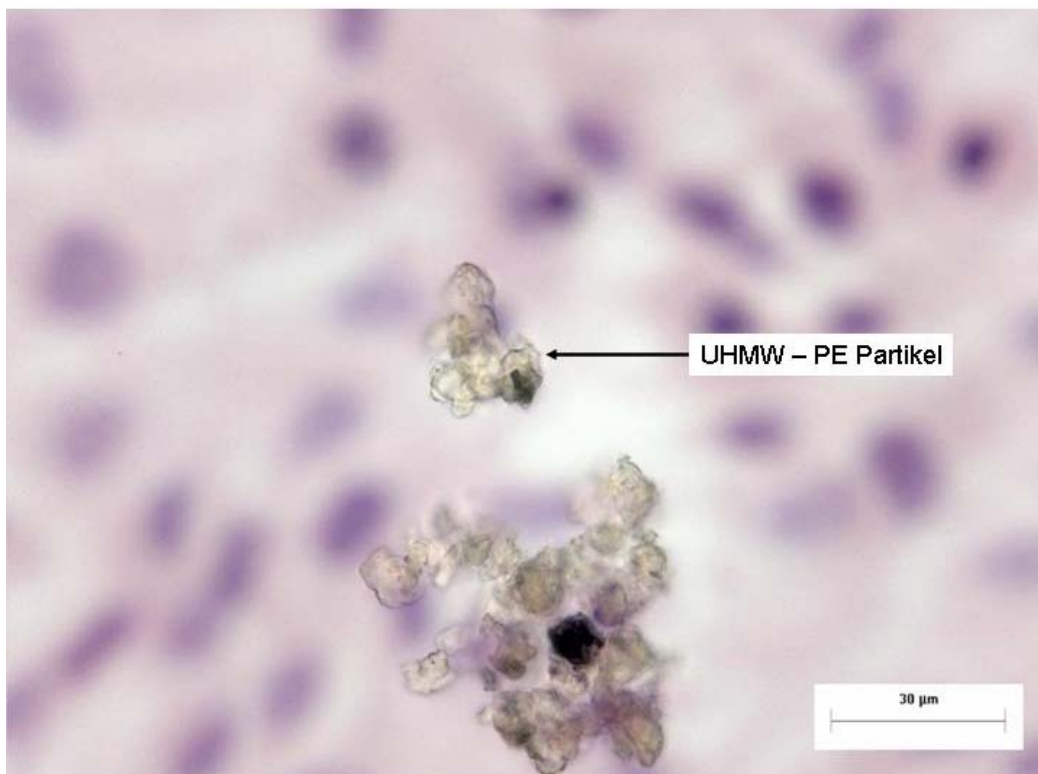


Abb. 76: Giemsa gefärbte Knochenmarkszellkultur nach 14 Tagen. Es handelt sich hier um dieselbe Ansicht wie oben, wobei hier das Konglomerat an Abriebpartikeln fokussiert wurde. Die grünlich dargestellten UHMW – PE Partikel sind deutlich zu erkennen. Da das Konglomerat die Zellen 3 – dimensional überragt, sind die länglich angeordneten vitalen Zellen hier unscharf dargestellt.

IV.Diskussion

Die durch Abriebpartikel induzierten aseptischen Osteolysen stellen weiterhin das Hauptproblem beim Versagen von implantierten künstlichen Gelenken im menschlichen Körper dar. Aktuelle Studien gehen davon aus, dass die von den künstlichen Implantaten erzeugten Abriebpartikel von Makrophagen phagozytiert werden, die dann über eine Zellaktivierung und die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren die Knochenresorption um das Implantat herum steigern.

Die in vorangegangenen Studien angefertigten histologischen Untersuchungen von periartikulärem Gewebe bei Revisionsoperationen von künstlichen Implantaten haben verschiedene Abriebpartikel bestehend aus Polymethylmetacrylat (PMMA), Metall und UHMW – PE gezeigt.

Die Größe der Partikel reichte von einer Größe kleiner als 1µm bis zu Partikeln die größer als 200µm waren. Es konnte gezeigt werden, dass die kleineren Partikel von Makrophagen phagozytiert wurden, während die größeren Partikel von Fremdkörperriesenzellen umgeben wurden. Das Periartikuläre Osteolytische Gewebe zeigte ein heterogenes Bild mit Arealen von Fibrose, Nekrose und Entzündlichen Infiltraten nebeneinander. Die meisten dieser Veränderungen stehen im Zusammenhang mit Makrophagen, obwohl auch gezeigt werden konnte, dass T – Zellen die entzündliche Immunantwort auf Abriebpartikel modulieren.

Bei dem Versuch eine Korrelation zwischen den einzelnen Reaktionen von Implantatmaterialien, Subtypen von Makrophagen und der Präsenz von T – Zellen zu ermitteln hat sich gezeigt, dass die Reaktion jeweils von der Art der Abriebpartikel abhängt. Unterschiedliche Implantatmaterialien rufen unterschiedliche Reaktionen im menschlichen Körper hervor.

Um die Effekte der verschiedenen Abriebpartikel aus Metall, Polyethylen oder dem verwendeten Knochenzement Polymethylmethacrylat, die bei der Verwendung von künstlichen Gelenken auftreten, auf das Immunsystem untersuchen zu können, wurden bis heute zahlreiche Tierversuche durchgeführt [Howie & Vernon – Roberts 1988; Spector, Shortkroff, et. al. 1990; Goodman, Aspenberg, et. al. 1995; Trindade, Song, et. al. 1999]. Sollte das Ziel dieser Studien das bessere Verständnis der Vorgänge die zur Partikelinduzierten aseptischen Prothesenlockerung führen, muss man diese

Tierversuche heutzutage doch kritisch betrachten. Zum einen existieren bereits viele Ergebnisse aus Zellkulturstudien, vor allem auch aus Zellkulturmodellen mit humanen Zellen, die Einblicke in die Reaktionen der Zelllinien auf die verwendeten Implantatmaterialien geben [Allen, Myer, et. al. 1997; Haynes, Boyle, et. al. 1998; Haynes, Crotti, et. al. 2000; Wilke, Orth, et. al. 1998; Wilke, Endres, et. al. 2002; Wilke, Stürz, et. al. 2003; Rader, Baumann, et. al. 1999]. Zum anderen gibt es mehrfach durchgeführte Untersuchungen von periprothetischem Gewebe aus Revisionsoperationen von Hüftprothesen, welche Hinweise auf die Art und Weise der zellulären Reaktion und die damit involvierten Zytokinen geben [Willert 1977; Goldring, Schiller, et. al. 1983; Santavirta, Hoikka, et. al. 1990; Jiranek, Machado, et. al. 1993, Chiba & Rubash 1994; Granchi, Ciapetti, et. al. 1999; H. – G. Willert, G. H. Buchhorn, et. al. 2000; Stea, Visentin, et. al. 2000]. Als Beispiel lassen sich Untersuchungen von Gewebe aus der Synovia und der Grenzzone zwischen Implantat und Knochen nennen, bei denen bei der Verwendung von Metall / Metall Paarungen aufgrund des geringen Abriebs nur eine gringe makrophagenvermittelte Fremdkörperreaktion beobachtet. Es wurde allerdings im Vergleich zu der Kombination Aluminiumoxid / Polyethylen sowie den früher verwendeten Chrom – Cobalt – Molybdänprothesen eine deutlich stärkere lymphozytäre Infiltration des Gewebes beobachtet [H. G. Willert, G. H. Buchhorn, et. al. 2000].

Bei allen experimentellen Ansätzen in den Versuchen mit Zellkulturen oder in Tiermodellen wurde der Kontakt zwischen dem zu untersuchenden soliden Prüfkörper oder einer großen Anzahl von Abriebpartikeln akut hergestellt. Die Wirklichkeit jedoch zeigt, dass das Auftreten von Abrieb an den Gelenkflächen der künstlichen Gelenkpartner und der Transport in den Knochen von Becken und Femur ein langsam fortschreitender, kontinuierlicher Prozeß ist. Weitere Faktoren wie der Abtransport von Partikeln über Lymphgefäße, die Freisetzung von Ionen aus Metallverbindungen und deren Ausscheidung über den Urin sind ausschlaggebend für die Toxizität und die lokale und systemische Immunantwort. Da diese biologischen Gegebenheiten seit langem bekannt sind, müssen sie auch bei der Bewertung unserer Ergebnisse berücksichtigt werden.

Man ist sich heute darüber einig, dass neben der Materialzusammensetzung auch die Größe der Abriebpartikel einen Einfluss auf die Qualität der zu erwartenden Immunreaktion hat. Teilchen, welche zu groß für eine Aufnahme durch Makrophagen

oder Fremdkörperriesenzellen sind, führen eher zu einer milderen Reaktion als kleinere, leichter phagozytiserbare Partikel [Horowitz, Gautsch, et. al. 1991; Gelb, Schumacher, et. al. 1994; Green, Fisher, et. al. 2000].

In dieser Studie wurde die Reaktion einer humanen Knochenmarkszellkultur auf industriell gefertigte UHMW – Polyethylen – Partikel untersucht. UHMW – PE ist das standardmäßig verwendete Material für die Innenbeschichtung von Gelenkpfannen bei Hüft – Totalendoprothesen.

Für die biologischen Reaktionen des Organismus auf UHMW – PE gibt es bereits zahlreiche Studien und verschiedene Kulturmodelle.

Ziel dieser Studie war es, auf der Basis eines etablierten Zellkulturmodells einer humanen Knochenmarkszellkultur [Kalla, Hintz – Obertreis, et. al. 1991] die biologischen Effekte von UHMW – PE auf das Gewebe zu untersuchen, welches engen Kontakt zur Implantatoberfläche und dem kontinuierlich auftretendem Abrieb hat – das humane Knochenmark.

In dieser Studie ist es zum Ersten Mal gelungen, adhärente humane Knochenmarkszellen in einer wässrigen Kultur in direkten Kontakt mit UHMW – PE – Abriebpartikeln zu bringen, was der in situ Situation am ehesten entspricht. Bisherige Modelle, die mit PE – Partikeln gearbeitet haben, haben versucht den Kontakt zwischen Zellen und PE – Abriebpartikeln über schwimmende Kulturen und Durchflusskammern zu erzeugen.

Bei Untersuchungen des periprotetischen Gewebes bei gelockerten Hüftprothesen und der Trennung der Abriebpartikel vom restlichen Gewebe wurden unterschiedliche Angaben über die Größe der gefundenen Abriebpartikel gemacht. Einige Studien fanden sowohl Partikel einer Größe von durchschnittlich 0,3 µm, aber auch gleichzeitig Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 10 – 15 µm [Affato, S , Fernandes, B et. al. 2000]

Für die inflammatorischen Prozesse, die letztendlich zur vorzeitigen aseptischen Lockerung von Prothesen führen, sind vor allen Dingen kleine Partikel, welche phagozytiserbar sind ($\leq 10 \mu\text{m}$), von Bedeutung [Matthews, J. B., Besong, A. A. et. al. 2000; Jasty, M., Smith, E. 1992]

Die Partikel, die in dieser Studie verwendet wurden, waren mit einer durchschnittlichen Größe von 7,5 µm klein genug, um phagozytiert zu werden. Die Existenz von kleineren Partikeln konnte in der Rasterelektronischen Beobachtung nachgewiesen werden.

4. 1. Diskussion der Ergebnisse

4. 1. 1. Zellzahlen

Die von uns verwendete Knochenmarkszellkultur hat in den bisherigen Studien über einen Beobachtungszeitraum von zwei Wochen sowohl stabile Zellzahlen als auch unveränderte Anteile der verschiedenen Populationen von Granulozyten, Makrophagen / Monozyten, Lymphozyten und Stammzellen an der Gesamtzahl [Wilke, Orth, et. al. 1998; Wilke, Landgraff, et. al. 1999]

In dieser Studie wurde sowohl bei der Negativkontrolle, als auch bei den Kulturen mit Abriebpartikeln die Entwicklung der Zellzahlen über den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen bewertet.

Die Kulturen, die mit verschiedenen Konzentrationen an Abriebpartikeln kultiviert wurden zeigten bei der Zählung der nach zwei Wochen Kulturdauer übrig gebliebenen Zellen einen deutlichen Rückgang der Anzahl an vitalen Zellen gegenüber der Kontrollkultur.

Graphisch ist der deutliche Unterschied zwischen den vitalen und avitalen Zellen zu erkennen. Bei den Kulturen mit Abriebpartikeln waren die avitalen Zellen deutlich erhöht. Das verwendete Medium wies zum Zeitpunkt der Mediumwechsel in den Kulturen mit Abriebpartikeln bereits einen Farbumschlag von rot nach orange auf, bedingt durch eine Verringerung des pH – Wertes, während das Medium in der Kontrollkultur jeweils noch seine rote Farbe besaß.

4. 1. 2. Zytokine

Die Freisetzung der Zytokine folgte in dieser Studie einem einheitlichen Muster. Die drei untersuchten Kulturen mit UHMW – PE Abriebpartikeln reagierten unabhängig von der verwendeten Partikelkonzentration mit einer maximalen Zytokinausschüttung am Tag des 1. Mediumwechsels.

Die höchsten Werte für IL – 6 wurden am Tag des 1. Mediumwechsels gemessen. Der Mittelwert für die IL – 6 Freisetzung lag bei einer Partikelkonzentration von 10^7 bei 33.746 pg / ml und überstieg den Kontrollwert um ca. das 100fache. Die Zytokinfreisetzung sank im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraumes wieder ab.

Für die Freisetzung von TNF – α wurde die höchste Ausschüttung ebenfalls am Tag des 1. Mediumwechsels gemessen. Auch hier war die Höhe des Zytokinausschüttung unabhängig von der verwendeten Partikelkonzentration. Der Mittelwert der höchsten Ausschüttung lag bei einer Konzentration von 10^7 UHMW – PE Partikeln bei ca. 1000 pg / ml, und damit ebenfalls ca 100fach über dem Kontrollwert.

Weitere in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche sowohl mit Tivaniumpartikeln, als auch mit Chrom – Kobaltpartikeln ergaben für die jeweils maximal verwendete Konzentration an Abriebpartikeln ebenfalls ein Maximum an Zytokinausschüttung für TNF – α und für IL – 6 am Tag drei des Beobachtungszeitraumes [Wilke, Endres, et. al. 2002; Wilke, Stürz, et. al. 2003].

Die ermittelten Ergebnisse stimmen vom Muster der Zytokinausschüttung mit den Ergebnissen überein, die andere Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Zellkulturmodellen gefunden haben. Auffällig ist, dass viele Arbeitsgruppen einen relativ kurzen Beobachtungszeitraum von 24 h gewählt haben. Was die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL – 6 und TNF – α betrifft, so haben vergleichbare Studien mit anderen Zellkulturmodellen eine hohe Zytokinausschüttung nach Ablauf der Beobachtungsdauer von 24h gefunden [Hirashima, Y, Ishiguro, N. et. al. 2001; Green, T.R., Fisher, J et. al. 200; Boynton, E. L., Waddell, J, et. al. 1999; Matthews, J. B. Besong, A. A. et. al. 2000]

4. 1. 3. LDH

Als Parameter für das Ausmaß der Zellschädigung in der Zellkultur durch die Exposition mit UHMW – PE Partikeln wählten wir die LDH.

In allen Kulturen zeigte sich eine relativ konstante Ausschüttung von LDH unabhängig von der verwendeten Menge an Abriebpartikeln.

Die höchste Konzentration der LDH fand sich in den Kulturen mit Abriebpartikeln am Tag des 3. Mediumwechsels mit einer gemessenen Konzentration von 75 U / l in der Kultur mit 10^7 Partikeln gegenüber 36 U / l in der Kontrollkultur.

Während des gesamten Beobachtungszeitraumes liessen sich nur leichte Schwankungen in der Ausschüttung der LDH feststellen. Daher gehen wir aufgrund dieser Ergebnisse davon aus, dass die Zytokinfreisetzung nicht durch die Zellschädigung oder den Zelluntergang zu erklären ist, der durch die Exposition mit den Abriebpartikeln hervorgerufen wird.

4. 1. 4. FACS – Analyse

Vorausgegangene Studien mit einer humanen Knochenmarkszellkultur haben bereits FACS – Analysen unter anderen Versuchsbedingungen durchgeführt. Untersucht wurde unter anderem das Zellwachstum auf soliden Prüfkörpern aus Implantatmaterialien. Untersucht wurden die Veränderungen in den Populationen der Monozyten / Makrophagen, T – Lymphozyten und B – Lymphozyten [Wilke, Orth, et. al. 1998; Wilke, Landgraff, et. al. 1999].

Am Ende einer zweiwöchigen Kultur auf soliden Prüfkörpern aus Chrom – Kobalt – Molybdän konnte ein leichter, jedoch signifikanter Rückgang der CD – 2 positiven T – Lymphozyten nachgewiesen werden. Veränderungen in der Population der Monozyten / Makrophagen konnten zwar nicht nachgewiesen werden, jedoch wurde ein signifikanter Anstieg der CD – 19 positiven B – Lymphozyten festgestellt [Wilke, Orth, et. al. 1998; Wilke, Landgraff, et. al. 1999; Wilke, Ahmed, et. al. 1995; Wilke, Orth, et. al. 1995].

Über die Entwicklung von Granulozytenpopulationen und den Stammzellen liegen bis heute noch keine Daten vor.

Bezogen auf die CD – 2 positiven Zellen hat unsere Messung am Tag der höchsten Zytokinausschüttung einen signifikanten Rückgang der CD – 2 positiven Zellen in den Kulturen mit Abriebpartikeln gegenüber der Kontrollkultur ergeben.

Eine frühere Studie, die mit dem selben Zellkulturmodell gearbeitet hat, als Abrieb allerdings Chrom – Kobaltpartikel verwendet hat, konnte zwar einen Rückgang der CD – 2 positiven Zellen nachweisen, dieser allerdings war nicht signifikant [Wilke, Stürz, et. al. 2003]

In der Studie, welche solide Chrom – Kobalt – Molybdän – Prüfkörper verwendete, ließ sich über den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen ein leichter Anstieg des Anteils an Monozyten / Makrophagen nachweisen, jedoch war dieser Anstieg wiederum nicht signifikant [Wilke, Orth, et. al. 1998; Wilke, Landgraff, et. al. 1999].

In dieser Studie konnte am Tag der höchsten Zytokinausschüttung ein jeweils dreifach signifikanter Anstieg in der Population der Monozyten / Makrophagen in den Kulturen mit Abriebpartikeln gegenüber der Kontrollkultur beobachtet werden.

In der Studie unter Verwendung von Chrom – Kobaltpartikeln verringerte sich die Population mit zunehmender Partikelkonzentration, allerdings waren diese Ergebnisse nicht signifikant [Wilke, Stürz, et. al. 2003]

Besonderes Augenmerk wurde in dieser Studie auf die Entwicklung der B – Lymphozytenpopulation gerichtet. Das Anstiegen der IL – 6 Freisetzung spricht dafür, dass es zu einer Zunahme der Proliferation der B – Zellen gekommen ist. In den vorangegangenen Studien wurde ein Anstieg der CD – 19 positiven Zellen auf dem Modell mit solidem Prüfkörper gemessen [Wilke, Orth, et. al. 1998; Wilke, Landgraff, et. al. 1999]. Diese Studie ergab allerdings einen dreifach signifikanten Rückgang der B – Lymphozytenpopulation in den Kulturen mit Abriebpartikeln gegenüber der Kontrollkultur. Der Vergleich mit der Kultur mit Chrom – Kobaltpartikeln zeigt, dass es dort ebenfalls zu einem Abfall in der Population der B – Lymphozyten kam, der allerdings nicht signifikant war [Wilke, Stürz, et. al. 2003].

Bezogen auf die Population der Stammzellen ließ sich eine Erhöhung des Anteils an CD – 34 positiven Zellen nachweisen, der allerdings statistisch nicht signifikant war. Der Vergleich mit der Studie unter Verwendung von Chrom – Kobaltpartikeln zeigt einen Abfall der CD – 34 positiven Zellen, der allerdings ebenfalls nicht signifikant ist [Wilke, Stürz, et. al. 2003].

Bei den Granulozyten ließ sich unabhängig von der Konzentration der verwendeten Partikel ein leichter Anstieg der Population feststellen, der sich allerdings als nicht signifikant darstellt.

In der Vergleichskultur mit Verwendung von Chrom – Kobaltpartikeln zeigte sich ein Abfall in der Population der CD – 66b positiven Zellen, der allerdings ebenfalls nicht signifikant ist [Wilke, Stürz, et. al. 2003].

Weiterhin haben wir die Veränderungen der zytotoxischen T – Zellpopulation und der T – Helferzellpopulation beobachtet. Hierzu gibt es bisher keine vergleichbaren Daten für das von uns verwendete Zellkulturmodell.

Die Population der zytotoxischen T – Zellen zeigte am Tag der höchsten Zytokinausschüttung keine Veränderung in den Kulturen mit Abriebpartikeln im Vergleich zur Kontrollkultur, wobei in der Population der T – Helferzellen ein leichter Anstieg in den Kulturen mit Abriebpartikeln zu beobachten ist, der allerdings nur bei einer verwendeten Partikelkonzentration von 10^5 Partikeln einfach signifikant gegenüber der Kontrollkultur ist.

Die Ergebnisse unserer FACS – Analyse konnten die Annahme nicht bestätigen, dass die Freisetzung von IL – 6 zu einer Proliferation insbesondere der B –Lymphozyten führt. Festgestellt werden konnte jedoch, dass sich die Veränderungen in den einzelnen Populationen unabhängig von der Konzentration der verwendeten Partikel entwickelten. Die Aktivierung der B – Lymphozyten durch das Zytokin IL – 6 hätte eine Erhöhung der Rezeptordichte zur Folge gehabt, welche dann zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität der Zellen geführt hätte. Diese lässt sich im Mean – Wert ablesen. In keinem der Versuche konnte eine Zunahme der Rezeptordichte von B – Lymphozyten festgestellt werden. Obwohl es nicht ein Ziel dieser Studie war, die Zelldifferenzierung in einer humanen Knochenmarkszellkultur unter Partikelexposition zu untersuchen, konnte diese Untersuchung einen zusätzlichen Eindruck davon vermitteln, ob sich die von uns gemessenen Zytokine am Tag der höchsten Ausschüttung auf die Zusammensetzung der Knochenmarkszellkultur auswirken.

4. 1. 5. Zytokinprofil bei verschiedenen Zellzahlen ohne Partikelzusatz

In vorhergegangenen Studien wurde untersucht bei welcher Zellzahl pro Kultur die Veränderungen im Zytokinprofil über den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen am besten beurteilt werden können. Die besten Ergebnisse konnten bei zwei Millionen Zellen pro well erzielt werden.

4. 1. 6. Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Mediatoren

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die zu der humanen Knochenmarkszellkultur zugegebenen Wachstumsfaktoren keinen Einfluß auf die Zytokinexpression haben. Aus Kostengründen wurde dieser Teil des Experimentes in diesem Versuchsaufbau nicht noch einmal wiederholt [Wilke et. al. 1991 - 2000].

4. 1. 7. Vergleich mit anderen Zellkulturstudien

Die Effekte der verschiedenen Biomaterialien wurden in den vergangenen Jahren immer wieder in Zellkulturstudien untersucht. Die Reaktionen von insbesondere Makrophagen auf Partikel aus den Stoffen Chrom – Kobalt und Chrom – Molybdän wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben [Haynes, Rogers, et. al. 1993; Haynes, Boyle, et. al. 1998; Horowitz, Luchetti, et. al. 1998; Prabu, Shelburne, et. al. 1998; Haynes, Crotti, et. al. 2000].

Andere Arbeitsgruppen haben auf unterschiedliche Art und Weise versucht, die Effekte von UHMW – PE Partikeln auf den Organismus darzustellen. Eine Arbeitsgruppe untersuchte die Hypothese, inwieweit Abriebpartikel von künstlichen Gelenken Makrophagen im Gelenkspalt aktivieren, die dann wiederum dafür sorgen, dass sich die Stammzellen im Knochenmark zu Osteoklasten entwickeln, welche dann für den Abbau des Knochens verantwortlich sind. Um einen direkten Effekt der UHMW – PE Partikel auf den Knochen nachweisen zu können, beobachtete dieselbe Arbeitsgruppe die Reaktion von Knochenzellen bei direktem Kontakt mit UHMW – PE Abriebpartikeln [Hirashima, Y, Ishiguro, N et. al. 2001].

Hirashima et. al. untersuchten zwei unterschiedliche Hypothesen. Die eine Hypothese besagte, dass Abriebpartikel durch den Transport in den Gelenkspalt und über die Aktivierung von Makrophagen über die Freisetzung von proinflammatorischen

Zytokinen den Knochen sekundär beeinflussen und die Entwicklung von Osteoklasten begünstigen. Die andere Hypothese besagte, dass auch ein direkter Kontakt zwischen Knochen und UHMW – PE zu einer Veränderung im Knochen in Richtung Proliferation von Osteoklasten führt.

Verwendet wurden in der Studie von Hirashima et. al. Makrophagen, die aus Mäusen gewonnen wurden, sowie Knochenmarkszellen, die aus den Tibiae der verwendeten Mäuse gewonnen wurden. Gezeigt werden konnte am Ende des Beobachtungszeitraumes von 24 h ein signifikanter Anstieg der Zytokine IL – 6 und TNF – α in den Kulturen mit Makrophagen, sowie eine signifikante Zunahme an Knochenabbauenden Zellen in den Kulturen, die die Knochenmarkszellen beinhalteten [Hirashima, Y, Ishiguro, N et. al. 2001].

Auch wenn die von uns verwendete Kultur einen längeren Beobachtungszeitraum aufweist, konnten wir trotzdem für den ersten Zeitraum nach Aussäung der Knochenmarkszellen ähnliche Anstiege in der Ausschüttung der Zytokine nachweisen wie in der Studie von Hirashima.

Eine weitere Zellkulturstudie hat den Effekt von Polyethylenpartikeln auf humane Monozyten / Makrophagen in vitro untersucht. Hierzu wurden die verwendeten Abriebpartikel chemisch vorbehandelt, um die Veränderungen in den Reaktionen auf chemisch veränderte Partikel zu untersuchen [Boynton, E. L. Waddell, J. et. al. 1999].

Boynton wollte in seiner Studie überprüfen, welche Reaktionen humane Zellen auf die chemische Veränderung der verwendeten Polyethylenpartikel zeigen. Zu diesem Zweck untersuchte die Arbeitsgruppe um Boynton aus Monozyten entstandene Makrophagen und deren Reaktion auf imprägnierte Polyethylenpartikel. Die Studie konnte eine signifikante Erhöhung von IL – 1 β 24 h nach Exposition mit unbehandelten PE Partikeln zeigen. Bezogen auf die chemische Veränderung der PE Partikel konnte die Studie eine Erhöhung der Ausschüttung der Zytokine IL – 6 und TNF – α nur bei niedrig oxidiert veränderten PE Partikeln zeigen [Boynton, E. L. Waddell, J. et. al. 1999].

Trotz der Verwendung von UHMW – PE Partikeln in dieser Studie sind, mit der Studie von Boynton et. al., Übereinstimmungen im Bezug auf den Effekt des Polyethylen auf die proinflammatorischen Zytokine festzustellen.

Green et. al untersuchten in ihrem Zellkulturmodell den Effekt von in Agarose eingebetteten UHMW – PE Partikeln auf Peritonealmakrophagen. Hierzu wurden die

hergestellten Abriebpartikel in ein Agarosegel eingebettet, um die Reaktion von anschließend hinzugegebenen Peritonealmakrophagen über einen Zeitraum von 24 h zu beobachten [Green, T. R. Fisher, J. et. al. 2000].

Obwohl Green et. al. über den Beobachtungszeitraum von 24 h eine signifikante Erhöhung der Ausschüttung des Zytokins TNF – α beschreibt, konnte weder eine Erhöhung des Zytokins TNF - α noch des Zytokins IL – 6 gefunden werden [Green, T. R. Fisher, J. et. al. 2000].

Es fällt auf, dass diese Studie unter Verwendung von UHMW – PE in diesen Punkten abweichende Ergebnisse zeigt.

Der Vergleich mit anderen Zellkulturstudien zeigt, dass Übereinstimmungen im Muster der Zytokinveränderungen in dem Ersten Beobachtungszeitraum existieren. Eine mögliche Schlussfolgerung kann sein, dass weder die Art der Zellkultur, noch die Dauer des Beobachtungszeitraumes von Bedeutung ist. Es bleibt festzustellen, dass das in dieser Studie verwendete Zellkulturmodell aber den Bedingungen in vivo am nächsten kommt.

4. 2. Vorgang der partikelinduzierten, aseptischen Prothesenlockerung

Die Untersuchung des periprotetischen Gewebes bei Revisionsoperationen gelockerter Hüftgelenke hat bei neueren Metall / Metall – Gleitpaarungen im Gegensatz zu sonst verwendeten herkömmlichen Paarungen aus Al_2O_3 – Keramik und Polyethylen neben Ansammlungen von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen vor allen Dingen ausgeprägte lymphozytäre Infiltrate mit sekundären Keimzentren gezeigt [H. – G. Willert, G. H. Buchhorn, et. al. 2000]

Die erhöhte Produktion von IL – 1β , IL – 6 und TNF – α in Geweben von Revisionen gelockerter Prothesen wurde für die häufiger verwendeten Materialien Tivanium (Titanium – Aluminium – Vanadium) Polyethylen und Polymethylmethacrylat mehrfach beschrieben [Dorr, Bloebaum, et. al. 1990; Kim, Rubash, et. al. 1993; Chiba & Rubash 1994; Kontinen, Kurvinen, et. al. 1996].

Von Trindade et. al. wurde der Einfluss von Interferon – γ auf die Zytokinsekretion humaner Monozyten / Makrophagenkulturen beschrieben [Trindade, Lind, et. al 1999]. Hiernach wird die Freisetzung von TNF – α und IL – 6 durch INF – γ bei entsprechendem Partikelkontakt verstärkt. Außerdem wird die Kollagensynthese sowie die Proliferation und die Funktion der Osteoblasten durch INF – γ gehemmt. Gebildet

wird INF – γ von den Natürlichen Killerzellen und den T – Lymphozyten. Es ist anzunehmen, dass dieser Mediator im Prozess der aseptischen Prothesenlockerung ebenfalls eine Rolle spielt.

Die FACS – Analysen in dieser Zellkulturstudie haben keine sicheren Hinweise für die Bedeutung der Lymphozyten bei der Immunantwort auf UHMW – PE – Partikel ergeben. Sowohl die CD – 2 positiven Populationen der T – Zellen und der Natürlichen Killerzellen, aber auch die CD – 19 positiven Populationen der B – Lymphozyten zeigten bei unserer FACS – Analyse sinkende Zellzahlen und damit auch eine abnehmende Fluoreszenzintensität. Die abnehmende Fluoreszenzintensität entspricht einer Verminderung der Oberflächenrezeptoren für die entsprechende CD – positive Zellpopulation. Über die Stoffwechselaktivität der Lymphozyten kann mit den von uns verwendeten Oberflächenmarkern keine Aussage getroffen werden. Für die Beteiligung der lymphozytären Zellen spricht in unserem Modell die Zytokinexpression. Wir konnten starke Anstiege in der Freisetzung von IL – 6 beobachten, welches unter anderem von Makrophagen und T – Lymphozyten produziert wird. IL – 6 ist verantwortlich für die Induktion der Ausreifung von B – Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Zellen ebenso wie das Wachstum und die Differenzierung von T – Lymphozyten. Über einen Mechanismus im Rahmen eines negativen Feedbacks hemmt IL – 6 die Produktion von TNF – α und IL – 1 in Makrophagen [Durum, S.K. & Muegge, K. 1998]. Dieser Mechanismus könnte eine Erklärung für die vergleichsweise niedrigen Spiegel von TNF – α und IL – 1 β in unseren Versuchsergebnissen sein, obwohl keine Suppression von IL – 1 β und TNF – α stattgefunden hat.

In dem von uns verwendeten Zellkulturmodell einer humanen Knochenmarkszellkultur haben sich die Zytokine IL – 6 und TNF – α als entscheidende Mediatoren bei der Immunreaktion auf UHMW – PE – Partikel dargestellt. Bei vergleichbaren Kulturen mit dem selben Zellkulturmodell und der Verwendung von Titanpartikeln bzw. der Verwendung von Chrom – Kobalt – Partikeln ergab sich ein ähnliches Zytokinprofil. Für IL – 1 β ergab sich allerdings bei beiden Metallpartikeln eine Messbarkeit der Werte nur bei hohen, bereits toxischen Partikelkonzentrationen [Wilke, Endres, et. al. 2002; Wilke, Endres, Stürz, Traub, Wessel, Griss et. al. 2000].

TNF – α kann von den meisten Zellen produziert werden. Unter anderem auch von Monozyten / Makrophagen, Natürlichen Killerzellen, Granulozyten, T – und B –

Lymphozyten. $\text{TNF} - \alpha$ steigert die phagozytäre Aktivität von Makrophagen und Granulozyten und fördert die Differenzierung von Monozyten. Weiterhin induziert es die Zytokine $\text{IL} - 1$ und $\text{IL} - 6$, es reguliert die Funktion und die Proliferation von T- und B-Zellen und steigert die Myelopoese [L. Rink 1998].

Die von uns gemessenen Zytokinprofile in dieser Zellkultur sprechen dafür, dass die Monozyten / Makrophagen und die T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle in der Fremdkörperreaktion auf UHMW-PE-Partikel spielen. Hiernach lässt sich annehmen, dass nach der Phagozytose der Partikel es zunächst zu einer Ausschüttung von $\text{TNF} - \alpha$ sowie zu einer Ausschüttung von $\text{IL} - 1\beta$ in geringen Mengen kommt. Beides sind Faktoren einer frühen, unspezifischen Entzündungsreaktion die mit einer Aktivierung und Ausreifung von Makrophagen und Lymphozyten einhergehen. Diese führen dann zur Produktion von $\text{IL} - 6$, welches zur Hemmung von Osteoblasten, der Differenzierung von Osteoklasten und damit zu einer Förderung der knochenresorptiven Vorgänge führt.

Da der Abrieb künstlicher Hüftgelenke entsprechend der Aktivität der Patienten ständig neue Partikel produziert, werden dieser Art Vorgänge in vivo immer weiter unterhalten. In den von uns durchgeführten Experimenten konnte die Auswirkung auf die Proliferation einzelner Populationen in ersten, orientierenden durchflusszytometrischen Versuchen nicht differenziert dargestellt werden. Dazu sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl notwendig. Die weitere Beobachtung anderer Zellpopulationen, z. B. die Beobachtung von Natürlichen Killerzellen, sowie die Freisetzung weiterer Mediatoren wie das Interferon- γ können für das genauere Verständnis der immunologischen Vorgänge, wie sie bei der partikelinduzierten aseptischen Prothesenlockerung vorkommen, von Bedeutung sein.

4. 3. Resümee

Ziel unserer Versuche war es, die Wirkung von UHMW – PE – Abriebpartikeln auf humane Knochenmarkszellen zu untersuchen. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Herangehensweise zeichnet sich vor allem durch drei Umstände aus: der humane Ursprung der von uns verwendeten Zellen, die Nähe zu Implantatmaterialien in vivo und die Tatsache, dass es sich bei der von uns verwendeten Kultur um eine Primärkultur und nicht um eine permanente, veränderte oder eine Tumorzelllinie handelt. Aufgrund dieser Umstände empfiehlt sich dieses Zellkulturmodell besonders zur Durchführung von „in vitro“ Studien auf dem Gebiet der partikelinduzierten Prothesenlockerung.

Es ist bekannt, dass UHMW – PE – Partikel ab einer Konzentration von mehr als einem Partikel / Zelle über einen Zeitraum von zwei Wochen deutliche zytotoxische Effekte hervorrufen. Trotzdem sind die humanen Knochenmarkszellen in der Lage, über den Beobachtungszeitraum proinflammatorische Zytokine zu exprimieren. Nach Zugabe der Partikel zu den Kulturen konnten wir eine starke Erhöhung der Sekretion von IL – 6 beobachten. Zeitgleich zu diesem Anstieg von IL – 6 kam es ebenfalls zu einer vermehrten Freisetzung von TNF – α . Das Ausmaß der Freisetzung von TNF – α war zwar geringer als das von IL – 6, aber dennoch signifikant.

Die Steigerung der Sekretion von IL – 1 β durch die von uns verwendeten UHMW – PE Partikel war eher gering. Im Gegensatz zu den Versuchen unter Verwendung von Metallabriebpartikeln, ließ sich hier die Expression von IL – 1 β auch bei hohen Partikelkonzentrationen nicht steigern.

4. 4. Ausblick

Das langfristige Ziel der Studien unter der Verwendung von Abriebpartikeln ist es, neue Strategien für die Therapie und die Prävention partikelinduzierter aseptischer Prothesenlockerung zu finden. Unter genauer Betrachtung der von uns ermittelten Ergebnisse scheinen die Zytokine IL – 6 und TNF – α eine besondere Rolle in der Immunantwort auf Abriebpartikel zu spielen.

Mehrere frühere Zellkulturstudien haben bereits versucht, den Einfluss von Medikamenten auf die Produktion von Zytokinen und auf die Knochenresorption nach Exposition mit Abriebpartikeln darzustellen [Haynes, Rogers, et. al. 1996; Pandey, Quinn, et. al. 1996; Rader, Baumann, et. al. 1999].

Von Rader et. al. wurde die Suppression der Freisetzung des Zytokins TNF – α aus makrophagenähnlichen Zellen durch Bisphosphonate Etidronat und Ibendronat sowie Pentoxifyllin beschrieben. Einen ähnlichen Effekt erzielten [Rader, Baumann, et. al. 1999].

Der gleiche Effekt konnte in einem Tierversuch mit dem neuen Bisphosphonat TRK – 530 durch die Arbeitsgruppe Iwase et. al. gezeigt werden [Iwase, Kim, et. al. 2002].

Durch die Behandlung mit Etanercept, einem TNF – α - Rezeptor – Analogon konnte durch die Arbeitsgruppe Childs et. al. eine Sistieren der osteolytischen Prozesse beschrieben werden [Childs, Goater, et. al. 2001].

Weitere Zellkulturstudien unter der Verwendung humaner Knochenmarkszellen können durch FACS – Analyse Aufschluß über einzelne Zelllinien geben, welche vornehmlich an dem Vorgang der aseptischen Lockerung von Endoprothesen beteiligt sind.

Hieraus könnten dann in Zukunft neue Möglichkeiten der Prophylaxe und Therapie der partikelinduzierten Osteolysenbildung entwickelt werden, um eventuell mit Medikamenten an Schlüsselstellen der Immunantwort anzusetzen.

5. Zusammenfassung

5. 1. Fragestellung

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen und zu zeigen, inwieweit Abriebpartikel aus UHMW – PE in einer Kultur unter Verwendung von humanen Knochenmarkszellen die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen fördern, welche bei der aseptischen Lockerung von Prothesen eine wichtige Rolle spielen.

Zu diesem Zweck wurde die Ausschüttung der Zytokine IL – 6, IL - 1 β und TNF – α sowie die Freisetzung der LDH in unseren Kulturen über einen Beobachtungszeitraum von zwei Wochen unter Exposition verschiedener Partikelkonzentrationen beobachtet.

Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS – Analysen) sollten Hinweise auf die Veränderung und Entwicklung einzelner Zellpopulationen innerhalb der Knochenmarkszellkultur geben. Anhand spezifischer CD – Oberflächenantigene wurden die Anteile von Granulozyten, T – Lymphozyten, B – Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen und Stammzellen in unseren Kulturen bestimmt.

5. 2. Material und Methoden

Die Zellgewinnung erfolgte während der Primärimplantation von Hüft – TEPs durch Entnahme von Spongiosablöcken aus dem distalen Femur der Patienten. Die darauffolgende Aufbereitung erfolgte nach einem standardisiertem Protokoll mit anschließender Separation der weißen Zellreihe.

Die Kulturschalen wurden vor Zugabe der Zellen mit in Kollagen Typ 1 eingebetteten Partikeln in den Konzentrationen 10^5 , 10^6 , und 10^7 vorbereitet.

In den Kulturschalen wurden dann 2 Millionen Zellen / Well ausgesät und mit 2ml IMDM – Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte über einen Beobachtungszeitraum von 2 Wochen. Der Wechsel der Mediumüberstände erfolgte alle 2 Tage. Die Konzentrationen der Zytokine IL – 6, IL – 1 β und TNF – α sowie der LDH wurde dann aus den Überständen des Mediums bestimmt. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurde die Zellzahl in den verschiedenen Kulturen mit einem Cell – Counter bestimmt.

Am Tag der höchsten Zytokinausschüttung wurden FACS – Analysen durchgeführt mit denen dann die einzelnen Populationen von Granulozyten, T – und B – Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen sowie der hämatopoetischen Stammzellen ermittelt wurden.

5. 3. Ergebnisse

Über den von uns gewählten Beobachtungszeitraum von zwei Wochen haben wir insgesamt einen Rückgang der Zellzahl festgestellt, wobei sich die Verteilung der Zellen deutlich in Richtung avitaler Zellen gegenüber vitalen Zellen verschoben hat.

Die Messung der Zytokine ergab einen deutlichen Anstieg des IL – 6 am Tag drei in allen drei Kulturen, die mit verschiedenen Konzentrationen von UHMW – PE Partikeln kultiviert worden waren. Für TNF – α und für IL – 1 β fanden wir ebenfalls eine maximale Zytokinausschüttung am Tag drei der Zellkultur, unabhängig von der Konzentration der verwendeten Partikel. Die Untersuchung der LDH – Werte erbrachte keine signifikante Erhöhung in den Kulturen über den Beobachtungszeitraum.

Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab am Tag der höchsten Zytokinausschüttung für die Population der B – Lymphozyten eine dreifach signifikante Verminderung gegenüber den Kontrollkulturen. Bezüglich der Population der Monozyten / Makrophagen konnten wir am Tag der höchsten Zytokinexpression eine signifikante Erhöhung feststellen. Die Population der T – Lymphozyten hat sich am Tag der höchsten Zytokinausschüttung signifikant vermindert. Sowohl in den Populationen der Stammzellen und der Granulozyten, als auch in den Populationen der zytotoxischen T – Zellen und der T – Helferzellen konnten wir bis auf eine einfach signifikante Erhöhung der T – Helferzellen bei einer Konzentration von 10^5 Partikeln / Well keine weiteren signifikanten Veränderungen in den einzelnen Populationen feststellen.

5. 4. Diskussion

Die Studie konnte zeigen, dass Abriebpartikel aus UHMW – PE das Wachstumsverhalten und die Zytokinproduktion der Zellen in einer humanen Knochenmarkszellkultur beeinflussen. UHMW – PE sind als toxisch einzustufen.

Da die größten Veränderungen der Zytokinproduktion bei der Expression der Zytokine IL – 6 und TNF – α zu beobachten war, scheinen diese genannten Zytokine bei der Reaktion der humanen Knochenzellen auf Abriebpartikel eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Freisetzung von IL – 1 β ist in diesem Zusammenhang eher als untergeordnet zu betrachten.

In den FACS – Analysen konnten signifikante Veränderungen in einzelnen Zellpopulationen durch die Zytokinausschüttung nachgewiesen werden.

Bei Vergleichen mit anderen Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass der Beobachtungszeitraum einen großen Einfluss auf die Reaktion immunkompetenter Zellen auf die Abriebpartikel hat. Um genauere Aussagen über die Vorgänge bei der aseptischen Lockerung von Prothesen machen zu können, sollten Kulturen verwendet werden, die der Situation „in vivo“ möglichst nahe kommen. Die von uns verwendete Knochenmarkszellkultur ist dafür ein geeignetes Modell.

6. Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J.S., Übers. von Stadtler B. M., Hess, M: Immunologie, Verlag Hans Huber, Bern Göttingen, Toronto, Seattle, 1996

Affato, S, Fernandes, B, Tucci, A, Esposito, L, Toni, A.: Isolation and morphological characterisation of UHMWPE wear debris generated in vitro. Biomaterials 22 2325 – 2331, 2001

Aiello, F. B., Longo, D. L. Overton, R., Takacs L., and Durum, S. K.: A role for cytokines in antigen presentation: IL – 1 an IL – 4 induces accessory functions of antigen – presenting cells. J. Immunol. 144:2572 – 2581, 1990

Akatsu, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Imamura, K. Yamaguchi, A., Sato, K., Nagata, N., and Suda. T.: Role of prostaglandins in interleukin – 1 – induced bone resorption in mice in vitro. J. Bone Min. Res. 6:183 – 190, 1991

Baer, W. S. Arthroplasty with animal membrane Amer J surg 1918; 16:171

Barton, B.E. and Mayer, R.: IL – 3 and IL – 6 do not induce bone resorption in vitro. Cytokine. 2:217 – 220, 1990

Barton, J.R. A new treatment in the case if ankylosis. Amer J Med Sci 1838; 21:332.

Barton, J. R. On the treatment of ankylosis by the formation of artificial joints. N Amer surg 1827; J3: 279.

Begemann, H. and Raststetter, J. (eds): Kinetik der Granulozytopoese. In Klinische Hämatologie, pp. 76 – 77. Stuttgart; New York, Georg Thieme Verlag, 1993

Begemann, H. and Raststetter, J. (eds): Regulation der Granulopoese. In Klinische Hämatologie, pp. 77 – 78. Stuttgart; New York, Georg Thieme Verlag, 1993

Bertolini, D. R., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Smith, D. D., and Mundy, G. R. : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature*. 319: 516 – 518, 1986

Böcker, W., Denk, H., and Heitz, Ph. U.: Entzündung. In W. Böcker, H. Denk, and Ph. U. Heitz (eds), *Pathologie*, pp 65 – 96. Urban & Schwarzenberg Verlag München, Wien, Baltimore, 1997

Boynton, E. L., Waddell, J., Meek, E., Labow, R. S. , Edwards, V., Santerre, J. P. : The Effect of polyethylene particle chemistry on human monocyte – macrophage function in vitro *J. Biomed Mater Res*, 52, 239 – 245, 2000

Carter, A., Merchav, S., Silvia Draxler, I., and Tatarski, I.: The role of interleukin – 1 and tumor nekrosis factor alpha in human multiple myeloma. *Britisch Journal of Haematology*. 74:424 – 431, 1990

Case, C. P., Langkamer, V.G., Lock, R. J., Perry, M. J., Palmer, M. R., and Kemp, A., J.: Changes in the proportions of peripheral blood lymphocytes in patients with worn implants. *J Bone Joint Surg Br*. 82:748 – 754, 2000

Charnley, J. Anchorage of femoral head prosthesis to the shaft of the femur. J. Bone Joint surg. 1960; 42B: 28

Charnley, J., Follacci, F. M., and Hammond, B.T.: The long – term reaction of bone to self – curing acrylic cement. J. Bone Joint Surg.Br. 50:822 – 829, 1968

Chiba, J. and Rubash, H. E.: A biochemical, histologic, and immunohistologic analysis of membranes obtained from failed cemented and cementless total knee arthroplasty. Clin. Orthop. 278, 1994

Childs, L. M., Goater, J. J., O’Keefe, R. J., and Schwarz, E. M.: Efficacy of etanercept for wear debris – induced osteolysis. J. Bone Miner. Res. 16:338 – 347, 2001.

Coleman, R. F., Herrington, J., and Scales, J. T.: Concentration of wear products in hair, blood and urine after total hip replacement. Br. Med. J. 1:527 – 529, 1973

Crosier, P. S. and Crosier, K. E.: Granulocyte – Makrophage Colony – Stimulating – Factor (GM – CSF). In P.J. Delves and I.M. Roitt (eds), Encyclopedia of Immunology, 2nd ed., pp. 1020 – 1023. Academic Press INC., San Diego, 1998

Dewhirst, F. E., Stashenko, P.P. E. M. J., and Tsurumachi, T.: Purification and partial sequence of human osteoclast – activating factor: Identity with interleukin 1 beta. J. Immunology. 135:2562 – 2568, 1985

Dinarello, C.A.: An update on human interleukin – 1: from molecular biology to clinical relevance. J. Clin. Immunol. 5:277 – 297, 1985

Dorr, L. D., Bloebaum, R., Emmanuel, J., and Meldrum, R.: Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. Clin. Orthop. 82 – 95, 1990

Durum, S. K. and Muegge, K. : Cytokines Linkin the Immune and Inflammatory Systems: IL – 1, TNF, IL – 6, IFN – $\alpha\beta$ and TGF – β . In Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, Benjamin D. Schwartz, William T. Shearer, and Warren Strober (eds), Clinical Immunology, pp. 350. St.Louis, Mosby, 1998

Endres, S.: Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkszellkultur nach Exposition mit Tivanium – Abriebpartikeln. Medizinisches Zentrum für Operative Medizin II der Philipps – Universität Marburg. 2001

Escalas, F., Galante, J., and Rostoker, W.: Biocompatibility of materials for total joint replacement. J. Biomed. Mater. Res. 10:175 – 195, 1976

Flad, H. D. and Gemsa, D.: Zytokine. In Gemsa, D. (ed), Immunologie Grundlagen – Klinik – Praxis, 4 ed., pp. 45 – 69. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1997

Gluck, T. Die Invaginationsmethode der Osteo – und Arthroplastik. Berlin, Klin Wschr. 1890; 19:732

Goldring, S.R., Schiller, A. L., Roelke, M. Rourke, C. M., O'Neil, D. A., and Harris, W.H.: The synovial – like membrane at the bone – cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. J. Bone Joint Surg. Am. 65:575 – 584, 1983

Gowen, M., Wood, D. D., Ihrle, E. F., McGuire, M. K. B., and Russel, R. G. G.: An interleukin – 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. Nature. 306:378 – 380, 1983

Green, T. R., Fisher, J., Matthews, J. B., Stone, M. H., and Ingham, E.: Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 490 – 497, 2000.

Greenfield, E. M., Bi, Y., Ragab, A. A., Goldberg, V. M., and Van De Motter, R. R.: The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J. Orthop. Res.* 20:1 – 8, 2002

Hagenaars, C.E., Kawilarang – de Haas, E. W. M., van der Kraan, A. A., Dexter, T. M., and Nijweide, P. J.: Interleukin – 3 – dependent haemopoietic stem cell lines capable of osteoclast formation in vitro. *J. Bone Min. Res.* 6:947 – 954, 1991

Hattersley, G., Owens, J., Flanagan, A. M., and Chambers, T. J. : Macrophage colony stimulating factor (M – CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177:526 – 531, 1991

Haynes, D. R., Boyle, S. J., Rogers, S. D., Howie, D. W., and Vernon – Roberts, B.: Variation in cytokines induced by particles from different prosthetic materials. *Clin. Orthop.* 223 – 230, 1998

Henney, C. S.: Hematopoietic activities of interleukin 1. *Behring Inst. Mitt.* 165 – 169, 1988

Herberts, P. and Malchau, H.: Long – term registration has improved the quality of hip replacement: a review of the Swedish THR Register comparing 160.000 cases. *Acta Orthop. Scand.* 71:111 – 121, 2000

Hirashima, Y., Ishiguro, N., Kondo, S., and Iwata, H.: Osteoclast induction from bone marrow cells is due to pro – inflammatory mediators from macrophages exposed to polyethylene particles: a possible mechanism of osteolysis in failed THA. *J Biomed. Mater. Res.* 56: 177 – 183, 2001

Howie, D. W.: Tissue response in relation to type of wear particles around failed hip arthroplasties *J. Arthroplasty.* 5:337 – 348, 1990

Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C. H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T., Hirano, T., and.: IL – 6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.* 145: 3297 – 3303, 1990

Iwase, M., Kim, K., J., Kobayashi, Y., Itoh, M., and Itoh, T.: A novel bisphosphonate inhibits inflammatory bone resorption in a rat osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. *J. Orthop. Res.* 20: 499 – 505, 2002

Jansen, J.H., Kluin – Nelemans, J.C., Van Damme, J., Wientjens, G. J., Willemze, R., and Fibbe, W. E.: Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells. *J Exp. Med.* 175:1151 – 1154, 1992

Jasty, M, Smith, E.: Wear particles in total joint replacement and their role in periprosthetic osteolysis. *Curr Opin Rheumatol* 1992;4:204 – 209

Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J.S., Boyce, B., Broxmeyer, H., and Manolagas, S. C.: Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin – 6. *Science.* 257: 88 – 91 , 1992

Jiranek, W.A., Machado, M., Jasty, M., Jevsevar, D., Wolfe, H., J., Goldring, S. R., Goldber, M. J., and Harris, W. H.: Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistological techniques and in situ hybridization. *J. Bone Joint Surg. Am.* 75: 863 – 879, 1993

Johnson, R. A., Boyce, B. F., Mundy, G. R., and Roodman, G. D.: Tumors producing human tumor necrosis factor induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in mice. *Endocrinology*. 124: 1424 – 1427, 1989

Kalla, P., Hintz – Obertreis, P., Wilke, A., Griss, P., Seiler, F.R., Rude, E., and Krumwieg, D.: Bone marrow obtained during hip surgery: a novel source for studies of hemopoiesis in human long – term bone marrow culture (LTBMC). *Behring Inst. Mitt.* 93 – 98, 1991

Kim, K. J., Rubash, H. E., Wilson, S. C., D'Antonio, J. Al, and McClain, E. J.: A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin. Orthop.* 142 – 152, 1993

Konttinen, Y. T., Kurvinen, H., Takagi, M., Michelsson, J.E., Eklund, K. K., Nordsletten, L., Buo, L., Aasen, A. O., and Santavirta, S.: Interleukin – 1 and collagenases around loosening total hip prostheses. *Clin. Exp. Rheumatol.* 14:255 – 262, 1996

Kurihara, N., Chenu, C., Miller, M., Civin, C., and Roodman, G. D.: Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast – like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology*. 126:2733 – 2741 , 1990

Lee, J. M., Salvati, E. A., Betts, F., DiCarlo, E. F., Doty, S. B., and Bullough, P. G.: Size of mettalic and polyethylene debris particles in failed cemented total hip replacements, J. Bone Joint Surg. Br. 74:380 – 384, 1992

Linch, D. C.: Bone Marrow and Hemtapoiesis. In P. J. Delves and I. M. Roitt (eds), Encyclopedia of Immunology, 2nd ed., p. 374. Academic Press INC., San Diego, 1998

Lexer, E. Die freien Transplantationen. In: Neue deutsche Chirurgie, Enke, Stuttgart 1924

Lexer, E. Die gesamte Wiederherstellungschirurgie. Barth, Leipzig 1931

Lexer, E. Gelenktransplantationen. Med. klein 1908; 4:815

Lexer, E. Über freie Gelenktransplantationen. Langenbecks Arch. Chir. 1911; 95:827

Loken, M. R.: Immunfluorescence of surface markers. In Ormerod, M. G. (ed), Flow Cytometry, 3 ed., p.61. Bath, Avon, Oxford University Press, 2000

Lorenzo, J. A., Sousa, S. L., Alander, C., Raisz, L. G., and Dinarello, C. A.: Comparison of the bone – resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutine – stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to interleukin 1. Endocrinology. 121:1164 – 1170, 1987

Maloney, W. J., Smith, R. L., Schmalzried, T. P., Chiba, J., Huene, D., and Rubash, H.: Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. J Bone Joint Surg Am. 77:1301 – 1310, 1995

Margevicius, K. J., Bauer, T.W., McMahon, J. T., Brown, S. A., and Merritt, K.: Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J. Bone Joint Surg. Am.* 76:1664 – 1675, 1994

Marks, S. C. and Lane, P. W.: Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J. Hered.* 6:11 – 18, 1976

Matsuda, T. and Kishimoto, T.: Interleukin 6. In P. J. Delves and I. M. Roitt (eds), *Encyclopedia of Immunology*, 2nd ed., pp. 1458 – 1461. Academic Press INC., San Diego, 1998

Matthews, J. B., Besong, A. A., Green, T. R., Stone, M. H., Wroblewski, B. M., Fisher, J., Ingham, E.: Evaluation of the Response of Primary Human Peripheral Blood Mononuclear Phagozytes to Challenge with In Vitro Generated Clinically Relevant UHMWPE Particles of Known Size and Dose *J.Biomed Mater Res*, 52, 296 – 307, 2000

Metcalf, D.: The colony stimulating factors. In *The Haematopoietic Colony Stimulating Factors*, pp. 55 – 96. Elsevier, Amsterdam, 1984

Meurer, S. C.: CD2. In P. J. Delves and I. M. Roitt (eds), *Encyclopedia of Immunology*, 2nd ed., pp. 463 – 465. Academic Press INC., San Diego, 1998

Mirra, J. M., Amstutz, H. C., Matos, M., and Gold, R.: The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prothesis failure. *Clin. Orthop.* 221 – 240, 1976

Nerl, C.: Zellen des Monozyten – Makrophagen – Systems. In Begemann H. and Rastetter J. (eds), *Klinische Hämatologie*, 4ed., p. 78 Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1993

Okano, A., Suzuki, C., Takatsuki, F., Akiyama, Y., Koike, K., Nakahata, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Ozawa, K., and Asano, S.: Effects of interleukin – 6 on hematopoiesis in bone marrow – transplanted mice. *Transplantation*. 47:738 – 740, 1989

Osborn, J.F. Biomaterials and their application to implantation SSO Schweiz Monatsschr. Zahnheilkunde 1979 Nov, 89 (11): 1138 – 9. German. No abstract available

Owen, M.: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In Peck, W. A. (ed), *Bone and Mineral Research*, pp.1 – 24. Amsterdam, Elsevier, 1985

Pandey, R., Quinn, J., Joyner, C., Murray, D. W., Triffitt, J. T., and Athanasou, N. A.: Arthroplasty implant biomaterial particle associated macrophages differentiate into lacunar bone resorbing cells. *Ann. Rheum. Dis.* 55:388 – 395, 1996

Pandey, R., Quinn, J. M., Sabokbar, A., and Athanasou, N. A.: Bisphosphonate inhibition of bone resorption induced by particulate biomaterial – associated macrophages. *Acta Orthop. Scand.* 67:221 – 228, 1996

Pazzaglia, U.E., Dell'Orbo, C., and Wilkinson, M. J.: The foreign body reaction in total hip arthroplasties. A correlated light – microscopy, SEM, and TEM study. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 106:209 – 219, 1987

Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G. R., and Roodman, G. D.: Interleukin – 1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *Journal of Bone Mineral Research*. 4:113 – 118, 1989

Pioletti, D. P., Leoni, L., Genini, D., Takei, H., Du P., and Corbeil, J.: Gene expression analysis of osteoblastic cell contacted by orthopedic implant particles. *J Biomed. Mater. Res.* 61:408 – 420, 2002

Rader, C. P., Baumann, B., Sterner, T., Rolf, O., Hendrich, C., Schutze, N., and Jakob, F.: TNF – alpha secretion by human macrophage – like cells in response to wear particles and its modification by drugs. *Biomed. Tech. (Berl)*. 44:135 – 141, 1999

Rink, L.: Tumor Necrosis Factor α . In P. J. Delves and I. M. Roitt (eds), *Encyclopedia of Immunology*, 2 ed., pp. 2435 – 2440. Academic Press INC., San Diego, 1998

Roodman, G. D.: Interleukin – 6: An osteotropic factor ? *J. Bone Miner. Res.* 7:475 – 478, 1992

Santavirta, S., Hoikka, V., Eskola, A., Konttinen, Y. T., Paavilainen, T., and Tallroth, K.: Aggressive granulomatous lesions in cementless total hip arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Br.* 72: 980 – 984, 1990

Schmalzried, T. P., Campbell, P., Schmitt, A.K., Brown, I. C. and Amstutz, H. C.: Shapes and dimensional characteristics of polyethylene wear particles generated in vivo by total knee replacements compared to total hip replacements. *J. Biomed. Mater. Res.* 38:203 – 210, 1997

Schrader, J. W.: Interleukin 3. In P. J. Delves and I. M. Roitt (eds), *Encyclopedia of Immunology*, 2nd ed., pp. 1442 – 1446. Academic Press INC., San Diego, 1998

Semlitsch, M. and Willert, H. G.: Biomaterialien für Implantate in der orthopädischen Chirurgie. *Medizintechnik*. 101:66 – 72, 1981

Semlitsch, M. and Willert, H. G.: Implant materials for hip endoprostheses: old proofs and new trends. *Arch Orthop. Trauma Surg.* 114:61 – 67, 1995

Shanbhag, A. S., Jacobs, J. J., Glant, T. T., Gibert, J. L., Black, J., and Galante, J. O.: Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J. Bone Joint Surg. Br.* 76:60 – 67, 1994

Shettlemore, M. G. and Bundy, K. J.: Toxicity measurement of orthopedic implant alloy degradation products using a bioluminescent bacterial assay. *J. Biomed. Mater. Res.* 45:395 – 403, 1999

Smith – Peterson, M. N. Arthroplasty of the hip. A new method. *J Bone Joint Surg.* 1939; 21:169

Smith – Peterson, M. N. Evolution of the mould arthroplasty of the hip joint. *J Bone Joint surg* 1948; 30B:59

Spector, M., Shortkroff, S., Hsu, H. P., Lane, N., Sledge, C. B., and Thornhill, T. S.: Tissue changes around loose prostheses. A canine model to investigate the effects of an antiinflammatory agent. *Clin. Orthop.* 140 – 152, 1990

Stea, S., Visentin, M., Granchi, D., Ciapetti, G., Donati, M. E., Sudanese, A., Zanotti, C., and Toni, A.: Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine.* 12:1575 – 1579, 2000

Steward, W. P.: Granulocyte and granulocyte – macrophage colony – stimulating factors. *Lancet.* 342:153 – 157, 1993

Suzuki, C., Okano, A., Takatsuki, F., Miyasaka, Y., Hirano, T., Kishimoto, T., Ejima, D., and Akiyama, Y.: Continuous perfusion with Interleukin 6 (IL – 6) enhances production of hematopoietic stem cells (CFU – S). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:933 – 938, 1989

Stürz, S.: Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkszellkultur nach Exposition mit Chrom – Kobalt – Abriebpartikeln. Medizinisches Zentrum für Operative Medizin II der Philipps – Universität Marburg. 2003

Trinidad, M. C., Song, Y., Aspenberg, P., Smith, R. L., and Goodman, S. B.: Proinflammatory mediator release in response to particle challenge: studies using the bone harvest chamber. J.Biomed. Mater. Res. 48:434 – 439, 1999

Urban, R. M., Jacobs, J. J., Tomlinson, M. J., Gavrilovic, J., Black, J., and Peoc'h, M.: Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. J Bone Joint Surg Am. 82:457 – 476, 2000

Vermes, C., Chandrasekaran, R., Jacobs, J.J., Galante, J. O., Roebuck, K.A., and Glant, T. T.: The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG – 63 osteoblasts. J Bone Joint Surg Am. 83 – A: 201 – 211, 2001

Wang, K.Y., Horne, J.G., Devane, P.A. Wilson, T., Miller, J.H.: Chemical eluates from ultra – high molecular weight polyethylene and fibroblast proliferation. J. of Orthopaedic Surgery 2001, 9(1): 25 – 33

Wang, K.Y., Horne, J.G., Devane, P.A. Wilson, T., Miller, J.H.: Polyethylene particles from a hip simulator cause ⁴⁵Ca release from cultured bone J. of Orthopaedic Surgery 2001, 9(2): 23 – 30

Wilke, A.: Die humane Knochenmarkszellkultur. Modell zur Biokompatibilitätstestung von orthopädisch relevanten Implantatmaterialien. Medizinisches Zentrum für Operative Medizin II, Philipps – Universität, Marburg, 1997

Wilke, A., Ahmed, M., Nagel, R., Kienapfel, H., Orth, J., Griss, P., and Franke, R. P.: Cell – differentiation of human bone marrow cells depending on applied biomaterials. In P. Vincenzini, *Materials in Clinical Applications, Advances in Science and Technology* 12, 343 – 348. Techna Srl. 1995

Wilke, A., Endres, S., Griss, P., and Herz, U.: Cytokine profile of a human bone marrow cell culture on exposure to titanium – aluminium – vanadium particles. *Z. Orthop. Ihre Grenzgeb.* 140:83 – 89, 2002

Wilke, A., Landgraff, M., Orth, J., Poenitz, H., Kienapfels, H., Boelte, K., Griss, P., and Franke, R. P.: Human bone marrow cell culture - A sensitive method for determination of the biocompatibility of implant materials. *ATLA*. 27:137 – 151, 1999

Wilke, A., Orth, J., Kienapfel, H., Schroder, G., and Griss, P.: Sensitivity of a human bone marrow cell culture to test the biocompatibility of different biomaterials. *Trans., 4th World Biomaterial Congress, April 1992, Berlin (162)*. 1992

Wilke, A., Orth, J., Landgraff, M., and Griss, P.: Die Beurteilung der Biokompatibilität von in der Orthopädie verwendeten Biomaterialien mit Hilfe einer humanen Knochenmarkszellkultur. *Orthopädische Praxis*. 9:636 – 640, 1995

Wilke, A., Orth, J., Lomb, M., Fuhrmann, R., Kienapfel, H., Griss, P., and Franke, R. P.: Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* 40:301 – 306, 1998

Willert, H. G.: Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 11:157 – 164, 1997

Willert, H G., Bertram, H., and Buchhorn, G. H.: Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra – high molecular weight polyethylene wear particles. Clin. Orthop. 95 – 107, 1990

Yoshida, H., Hayashi, S. – I., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. T., and Nishikawa, S. – I.: The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature. 345: 442 – 444, 1990

Zhu, Y.H., Chiu K.Y., Tang W.M.: Polyethylene wear and osteolysis in total hip arthroplasty J. of Orthopaedic Surgery 2001, 9(1): 91 – 99

Zichner, L.: In – vitro – Verschleiß der Gleitpaarungen Keramik – Polyethylen gegen Metall – Polyethylen beim Hüftgelenkersatz. In Jerosch, J., Effenberger, H., and Fuchs, S. (eds), Hüftendoprothetik, pp. 11 – 12. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1996.

Zinkernagel, R. M.: Grundlagen der Immunologie. In F. H. Kayser, K.A. Bienz, J. Eckert, and R. M. Zinkernagel (eds), Medizinische Mikrobiologie, 9 ed., pp. 81 – 82. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen / Herren in Marburg

| | | |
|--------------|---------------------|----------------|
| Arnold | Jungclas | Rothmund |
| Aumüller | Katschinski | Reichhardt |
| Barth | Kern | Remschmidt |
| Bartsch | Kienapfel | Schachtschabel |
| Basler | Klenk | Schäfer |
| Baum | Klose | Schlenzka |
| Beyer | Köhler | Schmidt |
| Christiansen | Koolmann | Schneyer |
| Christ | Krieg | Seifart |
| Czubayko | Lammel | Seitz |
| Daut | Lang | Steiniger |
| Doss | Lengsfeld | Stief |
| Feuser | Lippert | Stinner |
| Fruhstorfer | Maisch | Vogelmeier |
| Gemsa | Mueller | Vohland |
| Geus | Moll | Voigt |
| Gotzen | Moosdorf | Weihe |
| Griss | Oertel | Westermann |
| Grzeschik | Pfeiffer | Werner |
| Happle | Radsak | Westphal |
| Hasilik | Renz | Wilke |
| Hellinger | Richter | Wirth |
| Hesse | Röhm | Zielke |
| Herz | Rogauch | |
| Hofmann | Roth – Dobbelsstein | |

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2000 bis September 2004 im Labor für experimentelle Orthopädie der Phillips – Universität Marburg angefertigt.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Axel Wilke, für seine Unterstützung, seine Hilfsbereitschaft und seine Geduld bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt Frau Marita Kratz, MTA und Leiterin des Labors für experimentelle Orthopädie. Ohne ihre Unterstützung, ihr Wissen und ihre ständige Hilfsbereitschaft wäre die Fertigstellung dieser Arbeit wohl kaum möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Stefan Endres für seine Unterstützung und konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Frau Britta Kosche bedanken, MTA und Leiterin des Labors für Sondermethoden HPLC/AAS/Aminosäuren im Zentrallabor des Klinikums Lahnberge der Philipps – Universität Marburg, sowie bei Herrn Jörg Emmel für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der FACS – Analyse.

Ein weiterer Dank gebührt all den Freunden, die mir in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben, vor allen Dingen den Menschen, die immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.